

**Molekulare Analyse der tubulären Morphogenese
in *Drosophila melanogaster***

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
Dissertation

von Matthias Behr
aus Wolfhagen

1. Referent: PD. Dr. R. Schuh
2. Referent: Prof. Dr. H.-H. Arnold
eingereicht am: 07.Juli.2003
mündliche Prüfung am: 17.Oktober 2003

2003
(Druckjahr)

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse der Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor oder den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation:

Behr, M., Riedel, D. & Schuh, R. The claudin-like Megatrachea is essential in septate junctions for the epithelial barrier function in *Drosophila*. *Developmental Cell*, Vol.5, 611-620, (October, 2003).

Tagungsbeiträge:

Behr, M. & Schuh, R. Identification of novel gene functions which play a role during tracheal development. Poster. 42nd Annual *Drosophila* Research Conference, Washington, USA (2001).

Behr, M. & Schuh, R. *wurst*, a novel gene that is essential for tracheal branch formation in the *Drosophila* embryo. Vortrag. 8th Regional *Drosophila* Meeting, Würzburg (2001).

Behr, M. & Schuh, R. *megatrachea*: breaking the barrier. Vortrag. Symposium Graduiertenkolleg „Molekulare Genetik der Entwicklung“, Duderstadt (2002).

Behr, M. & Schuh, R. branch morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. Poster. 43rd Annual *Drosophila* Research Conference, San-Diego, USA (2002).

Behr, M. & Schuh, R. *megatrachea*: breaking the barrier. Vortrag. 17th European *Drosophila* Research Conference, Göttingen (2003)

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn PD. Dr. Reinhard Schuh, in der Abteilung Molekulare Entwicklungsbiologie am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt. Mitbetreut wurde die Arbeit von Prof. Dr. Hans-Henning Arnold von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans-Henning Arnold für seine Unterstützung und Betreuung der Arbeit an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Ich möchte mich besonders bei Herrn PD. Dr. Reinhard Schuh für seine fortwährende Betreuung, seine stetige Diskussionsbereitschaft und seine äußerst hilfreiche Unterstützung bedanken. Sein Engagement hat wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Frau Prof. Dr. Knust, Herrn Dr. Beitel, Herrn Prof. Dr. Bryant, Herrn Prof. Dr. Fehon, Herrn Prof. Dr. Hoch, Herrn Prof. Dr. Knoblich und Herrn Dr. Ulrich Schäfer möchte ich für die freundliche Bereitstellung von Information und wissenschaftlichen Materialien danken.

Herrn Dr. Dietmar Riedel danke ich für die großartige und schnelle Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Frau Friederike Schuh möchte ich für die Durchsicht des Manuskriptes danken. Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Herbert Jäckle, Herrn Dr. Ulrich Schäfer für ihre Diskussionsbereitschaft und Hilfestellungen. Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Herbert Jäckle für seine Unterstützung und die außergewöhnlich guten Arbeitsbedingungen bedanken.

Für die freundliche Hilfsbereitschaft danke ich Herrn Dr. Ulrich Nauber, Herrn Gordon Dowe und allen anderen Mitgliedern der Abteilung für Molekulare Entwicklungsbiologie. Insbesondere möchte ich mich auch bei meinen ehemaligen Laborkollegen/Innen Dr. Faye Mourkioti, Dr. Dierk Niessing, Dr. Thomas Häder und Dr. Christian Wolf und den jetzigen Laborkollegen Dr. Stephen Blanke, Boris Adryan, Nina Gerlach, Cindy Krause und Dr. Markus Stahl für das angenehme Arbeitsklima und die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Lena Becker und meinen Eltern für ihre Unterstützung.

für Lena

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>1</u>
<u>Abkürzungen</u>	<u>5</u>
<u>1 Einleitung</u>	<u>7</u>
1.1 Die Entwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.2 Die Entwicklung polarisierter Epithelien	11
1.2.1 Genetische Grundlagen der Zellpolarisierung im Blastoderm und Ektoderm	12
1.3 Die Bildung von Septate Junctions in ektodermalen Zellen	14
1.3.1 Molekulare Faktoren der Septate Junctions	15
1.4 Das Tracheensystem als Modellsystem polarisierter epithelialer Gewebe	17
1.4.1 Die frühe embryonale Entwicklung des Tracheensystems	17
1.4.2 Die späte embryonale Entwicklung des Tracheensystems	18
1.4.3 Mechanismen der stereotypen Tracheenentwicklung	19
1.5 Mechanismen der tubulären Morphogenese	21
<u>2 Ergebnisse</u>	<u>24</u>
2.1 Detektion von Gene, die an der trachealen Morphogenese beteiligt sind	24
2.1.1 Durchmusterung letaler P-mutanter Embryonen auf tracheale Defekte	24
2.1.2 Identifizierung von Genen, die tracheale Morphogenese kontrollieren	25
2.2 Molekulare Analyse von <i>megatrachea</i> (<i>mega</i>)	26
2.2.1 Die P-Linien G0012 und G0044 sind Allele von <i>megatrachea</i>	26
2.2.2 Identifizierung des Gens <i>mega</i>	28
2.2.3 MEGA ist ein Transmembranprotein mit einem PDZ-Binde-Motiv	28
2.2.4 MEGA ist ein Claudin ähnliches Protein	30
2.2.5 Expressionsstudie des <i>mega</i> Transkripts	32
2.2.6 Das MEGA Protein ist in ektodermalen epithelialen Geweben exprimiert	34
2.2.7 MEGA ist eine Septate Junction Komponente	36
2.3 Charakterisierung der <i>mega</i> Mutanten	40
2.3.1 <i>mega</i> ^{G0012} und <i>mega</i> ^{G0044} sind amorphe Nullmutanten	40
2.3.2 <i>mega</i> ^{EA97} und <i>mega</i> ^{VE896} sind hypomorphe <i>mega</i> Allele	40
2.4 Die embryonale <i>mega</i> Funktion	43
2.4.1 Die <i>mega</i> P-Mutanten zeigen eine veränderte Tracheenmorphologie	43
2.4.2 In <i>mega</i> Mutanten sind Länge und Durchmesser der Tracheenäste verändert	43
2.4.3 <i>mega</i> ist an der Ausbildung der Tracheenzellform beteiligt	44
2.4.4 Das Aktin- und Mikrotubulizytoskelett ist in <i>mega</i> Mutanten normal verteilt	46

2.4.5	MEGA ist nicht an der Polarisierung epithelialer Zellen beteiligt	47
2.4.6	MEGA ist an der Barrierefunktion epithelialer Zellen beteiligt	48
2.4.7	MEGA ist für die Ausbildung der SJ Struktur essentiell	50
2.5	Die MEGA Lokalisationsabhängigkeit	52
2.5.1	Die MEGA Lokalisation steht unter der Kontrolle von SINUOUS	52
2.5.2	MEGA, CORACLE und NEUREXIN beeinflussen gegenseitig ihre Lokalisation	53
2.6	Ausblick: MEGA verwandte Proteine in <i>Drosophila</i>	55
2.7	Identifizierung und molekulare Charakterisierung von <i>wurst</i>	57
2.7.1	Molekulare Analyse des Gens CG9089	57
2.7.2	CG9089 rettet den <i>wurst</i> ^{G0162} Letalitätsphänotyp	58
2.7.3	Das <i>wurst</i> ^{G0162} Reportergen ist in ektodermalen Geweben exprimiert	60
2.7.4	Die <i>wurst</i> mRNA wird in ektodermalen Epithelien exprimiert	61
2.7.5	WURST ist ein Transmembranprotein mit einer DnaJ-Domäne	62
2.7.6	WURST verwandte Proteine in Maus und Mensch	64
2.8	Charakterisierung der <i>wurst</i> Mutantenlinien	66
2.8.1	In <i>wurst</i> ^{G0162} mutanten Embryonen ist die <i>wurst</i> Expression reduziert	66
2.9	Funktionelle Analysen von <i>wurst</i>	67
2.9.1	<i>wurst</i> beeinflusst die Tracheenmorphologie	67
2.9.2	<i>wurst</i> ist an der Längenkontrolle der Tracheenäste beteiligt	69
2.9.3	<i>wurst</i> wirkt auf die tracheale Zellformgebung ein	69
2.9.4	<i>wurst</i> ist an der Lokalisation des anti-2A12 Lumenantigens beteiligt	70
2.9.5	<i>wurst</i> ist für die Gasfüllung des trachealen Lumens essentiell	71
3	<u>Diskussion</u>	<u>73</u>
3.1	MEGA ist ein lebensnotwendiges ektodermales Transmembranprotein	73
3.2	MEGA ist ein Septate Junction assoziiertes Protein	75
3.3	MEGA kontrolliert die Morphologie tubulärer Strukturen	78
3.4	MEGA interagiert mit CORACLE und NEUREXIN	79
3.5	MEGA ist ein <i>Drosophila</i> Claudin	80
3.6	Die <i>Drosophila</i> Claudinfamilie	81

3.7	<i>wurst</i> ist ein ektodermal transkribiertes Gen	82
3.8	<i>wurst</i> ist ein Transmembranprotein mit einer DnaJ-Domäne	82
3.9	<i>wurst</i> beeinflusst die Astlänge über die tracheale Zellform	83
3.10	<i>wurst</i> ist am Aufbau trachealer Röhren beteiligt	84
3.11	<i>wurst</i> greift in die tracheale Gasfüllung ein	84
4	<u>Material und Methoden</u>	<u>86</u>
4.1	Bezugsquellen	86
4.1.1	Standard-Chemikalien	86
4.1.2	Enzyme und Enzymsets	86
4.1.3	Radiochemikalien	86
4.1.4	Geräte	86
4.2	Puffer und Lösungen	87
4.3	Nährmedien für Fliegen	88
4.4	Nährmedien für Bakterien	88
4.5	Molekularbiologische Arbeitstechniken	88
4.5.1	Vektor zur Amplifikation und Subklonierung	88
4.5.2	Bakterienstämme	88
4.5.3	Extraktion genomischer DNA	89
4.5.4	Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA	89
4.5.5	DNA-Präzipitation	89
4.5.6	Restringieren der DNA	90
4.5.7	Dephosphorylierung restringierter DNA	90
4.5.8	Ligation von DNA-Fragmenten	91
4.5.9	Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	91
4.5.10	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	91
4.5.11	Herstellung von markierter antisense-RNA durch in vitro-Transkription	91
4.5.12	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen	92
4.5.13	Bakterientransformation durch Elektroporation	92
4.5.14	Plasmid-DNA-Mini-/Midi-/Maxi-präparation	92
4.5.15	Plasmidrettungs-„plasmid rescue“-Verfahren	93
4.5.16	Vervielfältigung genomischer DNA mittels der PCR	93
4.5.17	Vorbereitung der DNA zur Sequenzierung	95

4.5.18	Automatisierte DNA-Sequenzierung	95
4.5.19	Computer-Sequenz-Analysen	95
4.5.20	Affinitätschromatographische Aufreinigung der anti-MEGA Antisera	96
4.6	Embryologie und Genetik	97
4.6.1	Fliegenstämme	97
4.6.2	Fliegenhaltung	97
4.6.3	Keimbahntransformation zur Herstellung transgener Fliegenlinien	98
4.6.4	Ektopische Genexpression mit Hilfe des UAS-GAL4-Systems	98
4.6.5	Generierung von <i>mega</i> -Keimbahnchimären	98
4.6.6	Komplementationsstudien und Generierung transheterozygoter <i>mega</i> Mutanten	99
4.6.7	Reversionsanalyse von P-Elementintegrationsmutanten	101
4.6.8	Rettung <i>wurst</i> mutanter Phänotypen	102
4.6.9	Sammeln von Embryonen	103
4.6.10	Fixierung von Embryonen	103
4.6.11	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit antisense-RNA an Embryo-Totalpräparaten	103
4.6.12	Antikörperfärbung an Embryo-Totalpräparaten	104
4.6.13	Texas-Red®-dextran-Injektion in Embryonen	106
4.6.14	Arbeiten mit dem Zeiss-Axiophot-Mikroskop	106
4.6.15	Elektronenmikroskopie	107
4.6.16	Bestimmung von DH- und Tracheenzelllängen	107
4.6.17	Liste der benutzten Antikörper	108
4.6.18	Auflistung der verwendeten Fliegenlinien	109
5	<u>Literaturverzeichnis</u>	<u>111</u>
6	<u>Zusammenfassung</u>	<u>126</u>
7	<u>Lebenslauf</u>	<u>127</u>

Abkürzungen

Allgemeine Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
As	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	copy-DNA
DNase	Desoxyribonuklease
DNA	englisch. Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al.	et aliter
gr.	Gramm
k	Kilo-
kb	Kilobasenpaare
Da	Dalton
l	Liter
m	Milli-
n	Anzahl
nm	Nanometer
μ	Mikro-
M	Molar
mRNA	englisch, Boten-Ribonukleinsäure
OD	Optische Dichte
P-Element	Transposonelement
PCR	englisch, Polymerase Kettenreaktion
RNA	englisch, Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)amminometha
UAS	englisch. Upstream Activation Sequence
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
U	englisch, Units; Einheit der Enzymaktivität
WT	Wildtyp
°C	Grad Celsius

Kode der Nukleinsäuren:

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Kode der Aminosäuren:

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

Im Text erklärte, häufig verwendete Abkürzungen:

AJs	Adherens Junctions
DH	dorsaler Hauptstamm
EMS	Ethylmethansulfonat
MZ	Marginale Zone
OLR	Offener Leserahmen
pSJs	pleated Septate Junctions
SJs	Septate Junctions
sSJs	smooth Septate Junctions
TM	Transmembran-
ZA	Zonula Adherens

1 Einleitung

„Die Entwicklungsbiologie befasst sich mit einer Kernfrage der gesamten Biologie: Wie steuern Gene im befruchteten Ei das Verhalten der Zellen im Embryo und somit auch dessen Organisation, Gestalt und einen großen Teil seines Verhaltens?“

(Lewis Wolpert, Entwicklungsbiologie 1999)

Die Entwicklungsbiologie konnte im Laufe des letzten Jahrhunderts durch Studien klassischer Manipulationsexperimente bis hin zu modernen molekularbiologischen Untersuchungen entscheidend zum Verständnis selbstorganisatorischer Prozesse während der Ontogenese von Lebewesen beitragen (Übersicht: Wolpert, 1999). Hierbei war und ist *Drosophila melanogaster* (Meigen), nachfolgend verkürzt als *Drosophila* bezeichnet, eines der herausragenden Modellsysteme. Ausgehend von einer fast hundertjährigen Erfahrung im Bereich der klassischen Genetik war es durch eine systematische Mutagenisierung des *Drosophila* Genoms in den letzten zwei Jahrzehnten möglich, Gene zu identifizieren und molekular zu charakterisieren, die bei entwicklungsbiologischen Prozessen von entscheidender Bedeutung sind.

1.1 Die Entwicklung von *Drosophila melanogaster*

Die Taufliege *Drosophila* ist der Klasse der Insecta, der Ordnung der Diptera und der Familie der *Drosophilidae* zugeordnet.

Drosophila zeichnet sich durch eine schnelle Generationszeit, die bei 25°C innerhalb von 10 Tagen abgeschlossen ist, aus. Hierbei vollzieht sich die Embryogenese während der ersten 22 Stunden, es folgen drei Larvenstadien, die 24 Stunden (L1 und L2) bzw. 48 Stunden (L3) dauern. Anschließend erfolgt eine ca. viertägige Verpuppung in der die Puppe eine holometabole Metamorphose vollzieht. Etwa 12 Stunden nach dem Schlüpfen wird der Imago die Geschlechtsreife erreichen (Ashburner, 1989, Seyffert, 1998).

Zum Zeitpunkt der Befruchtung liegt die Eizelle als mit Dotter gefüllte, polarisierte Zelle vor (Übersicht: Ray und Schüpbach, 1996). Nach der Befruchtung der Eizelle vollziehen sich mehrere schnelle und synchrone Kernteilungen in der zentralen Dotterregion. Es entsteht das Plasmodium auch als „Synzytium“ bezeichnet. Nach der siebten Teilung wandern 8 bis 10 Kerne zum posterioren Pol des Embryos aus. Dort teilen sich die Kerne erneut zweimal und werden dann fest von einer Zellmembran umschlossen. Sie bilden die sogenannten „Polzellen“ bzw. Keimbahnzellen des Embryos (Wolpert, 1999). Währenddessen wandern auch die übrigen Kerne zur Peripherie. Am Kortex angelangt werden sie zwar von einem

Zytoskelett aber noch nicht von einer Zellmembran umgeben. Dieses Stadium, ca. 2 Stunden nach der Befruchtung, wird als „synzitiales Blastoderm“ bezeichnet. Während dieser Entwicklungsphase führt die Aktivität maternaler Faktoren an der embryonalen Längsachse zur regionsspezifischen Expression zygotischer Gene. Die zygotischen Gene werden entlang der anterior-posterioren Achse und der dorso-ventralen Achse aktiviert und sorgen für die Achsenfestlegung und Musterbildung im frühen Embryo. Aufgrund ihres mutanten Phänotyps werden die zygotischen Segmentierungsgene auch als Lückengene, Paarregelgene und Segmentpolaritätsgene bezeichnet. Die Lückengene werden als die ersten zygotischen Gene in breiten Banden entlang der Längsachse exprimiert. Die Lückengenprodukte kontrollieren die Genaktivität der nachfolgenden Paarregelgene. Die vorübergehend im Blastodermstadium aktiven Lücken- und Paarregelgenprodukte regulieren die regionsspezifische Expression der zu späteren Entwicklungsabschnitten wirkenden Segmentpolaritätsgene (Nüsslein-Volhard und Wieschhaus 1980, Wolpert, 1999).

Während der 13ten Kernteilung wird de Novo eine Zellmembran um die im Kortex liegenden Kerne eingezogen, so dass ein einschichtiges Epithel entsteht. Alle zukünftig gebildeten Gewebe stammen von dieser einen epithelialen Schicht ab. Das hieraus resultierende Stadium, ca. 3 Stunden nach der Befruchtung, wird als „zelluläres Blastoderm“ bezeichnet. In diesem Embryonalstadium (st) 5 (Stadieneinteilung nach Campos-Ortega und Hartenstein, 1997) wird den morphogenen maternalen Faktoren der Zugang zu den Kernen durch die Membran verwehrt. Dementsprechend ist die Koordination der Körperachsen bereits positionsspezifisch festgelegt (Wolpert, 1999).

Nach der Zellularisierung beginnt die Gastrulation (st6-7). Sie bewirkt eine Aufteilung des peripheren Epithels in die drei zukünftigen Keimblätter. Das außen liegende Ektoderm (ca. 3800 Vorläufer-Zellen), die zukünftige Amnioserosa und die neurogenen Regionen werden durch die an der embryonalen Außenseite verweilenden Epithelzellen und die Endbereiche von Stomodäum und Proktodäum gebildet. Die innen liegende Mesodermanlage entsteht (ca. 800 Vorläufer-Zellen) durch eine ventrale Einfurchung entlang der Längsachse („Ventralfurche“; Abb.1.1,A). Das zukünftige Entoderm (ca. 220 Vorläufer-Zellen) wird durch die Bildung des Stomodäums und des Proktodäums, die durch eine Invagination an der anterioren Ventralfurche und dem posterioren Pol entstehen, begrenzt. (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997; Wolpert, 1999).

Im Inneren des Embryos breitet sich während der Gastrulation auf der Ventralseite ein mehrschichtiges Band aus, der sogenannte „Keimstreifen“. Die Verlängerung des Keimstreifens (st7-11; Abb.1.1,B-D) findet ca. 4 Stunden nach der Befruchtung statt, wobei die maximale Ausdehnung zum st11 erreicht wird. Während der Keimstreifenverlängerung wandern die Polzellen in dorso-anteriore Richtung, so dass das posteriore Ende des

Embryos auf der Dorsalseite in Kopfnähe liegt. Mit der Gastrulation beginnt schließlich auch die Organogenese. Die ektodermalen Vorläuferzellen des zentralen Nervensystems und der Neuroblasten segregieren in das Embryoinnere. Die Invagination der anterioren und posteriore Mitteldarmanlagen beginnt. Ebenso invaginieren Stomodäum und Proktodäum, deren Endbereiche den späteren Vorder- bzw. Hinterdarm bilden. Relativ spät während der Keimstreifenverlängerung (ab st11 zum erstenmal sichtbar) bilden sich durch Invagination ektodermaler Zellen die trachealen Anlagen die 10 sogenannten „Tracheenplakoden“. Zum Ende der Keimstreifenverlängerung sind erste Anzeichen der epidermalen Segmentierung sichtbar (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997; Seyffert, 1998).

Durch die Keimstreifenverkürzung (Abb.1.1,E,F; st12-14; etwa 7,5 bis 11 Stunden nach der Befruchtung) stellt der Embryo die ursprüngliche Topologie wieder her, so dass zum Ende der Keimstreifenverkürzung das hintere Ende des Embryos den posterioren Pol erreicht. Währenddessen fusionieren der anteriore und posteriore Mitteldarm, die tubulären Äste des Tracheensystems wachsen aus und die beiden aus ektodermalen Vorläuferzellen entstammenden Speicheldrüsen werden angelegt (Seyffert, 1998).

Nach der Keimstreifenverkürzung ist der Embryo kurzzeitig dorsal offen und nur von einer Membran, der Amnioserosa, überspannt. Die dorsale Schließung erfolgt, indem sich ventral liegende Epidermiszellen nach dorsal über die Amnioserosa ausdehnen und an der dorsalen Mittellinie fusionieren (st14-15, 10,5 bis 13 Stunden nach der Befruchtung). Zur selben Zeit findet die Einstülpung des gesamten Kopfes mit Ausnahme der Mundhaken statt. Zum Ende der Embryogenese erfolgt die Ausdifferenzierung verschiedener Gewebe (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997, Seyffert, 1998)

Nach etwa 22 Stunden schlüpft eine vollständig ausgebildete segmentierte Larve (L1). Neben den 3 Kiefersegmente (C1-3) am Kopf sind die 11 Segmente am Rumpf aufgrund der Zähnchenbänder gut sichtbar. Sie unterteilen sich in die drei thorakalen (T1-3) und die acht abdominalen (A1-8) Segmente. Die zur Embryogenese festgelegte Segmentierung bleibt bis zur adulten Fliege erhalten. Neben der Segmentierung bilden sich im Embryo, durch mitotische Teilung, auch die Vorläufer der Imaginalscheiben aus. Diese stülpen sich während der Larvenentwicklung als epitheliale Säcke in das Körperinnere ein und bleiben bis zur Metamorphose erhalten. Die Metamorphose wiederum findet während der Verpuppung statt. Hierbei entstehen aus den Imaginalscheiben die meisten adulten Strukturen, während die übrigen larvalen Gewebe zum Teil lysiert werden (Cohen, 1993; Wolpert, 1999).

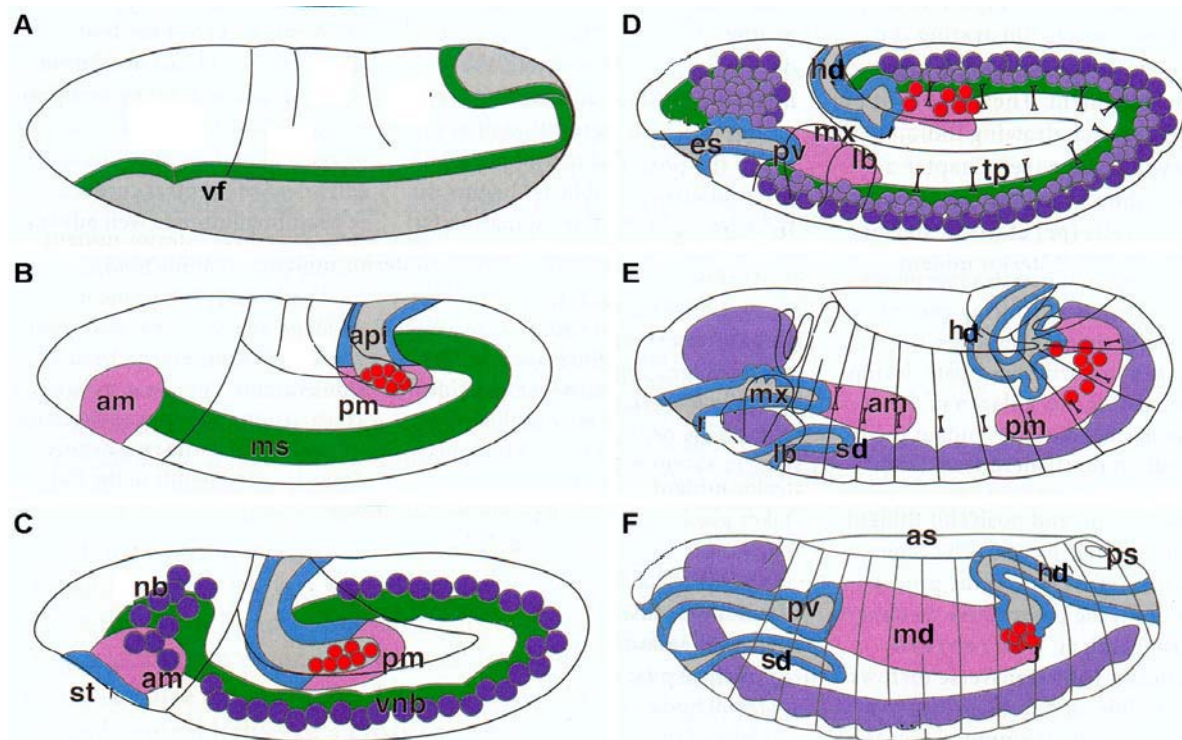


Abb.1.1: Schematische Darstellung der Embryonalentwicklung von *Drosophila*. Übersicht der embryonalen *Drosophila* Entwicklung von der Gastrulation bis zum Ende der Keimstreifenverkürzung (modifiziert nach Campos-Ortega und Hartenstein 1997). **(A):** Nach der Zellmembraninvagination im Blastodermstadium beginnt im Stadium (st) 6 die Gastrulation mit der Invagination der Ventralfurche (vf). **(B):** Zum st7 beginnt die schnelle Keimstreifenverlängerung, die große morphologische Veränderungen mit sich bringt. Das posteriore embryonale Ende wandert in dorso-anteriore Richtung. Das Mesoderm (ms), welches den Keimstreifen bildet, reicht vom anterioren Mitteldarmprimordium (am) bis zum posterioren Mitteldarmprimordium (pm). Die amnioproktodäale (api) Invagination findet statt. **(C)** Ab st9 verlangsamt sich die Streckung des Keimstreifens. Das Stomodäum (st) wird sichtbar und die Neuroblasten (nb; ventrale Neuroblasten: vnb) segregieren. **(D):** Bei der maximalen Streckung des Keimstreifens erreicht das hintere Ende des Embryos die Kopfregion. Die dem Ektoderm entstammenden Vorder- (Ösophagus [es], Proventrikulus [pv]) und Hinterdarm (hd) und die Tracheenplakoden (tp) werden zum ersten Mal sichtbar. Außerdem erscheinen das Maxillare- (mx) und das Labiale Segment (lb). **(E):** Mit dem st12 beginnt die Keimstreifenverkürzung. Die epidermale Segmentierung wird sichtbar und die Speicheldrüsen (sd) erscheinen. **(F):** Die Verkürzung der Keimstreifens ist zum st14 abgeschlossen, das hintere Ende des Embryos befindet sich wieder am posterioren Pol. Die dorsale Schließung beginnt, Epidermiszellen wachsen über die Amnioserosa (as). Die posterioren Spirakelöffnungen (ps) werden sichtbar, die Fusion des Mitteldarms findet statt (md). Anterior ist links und dorsal ist oben angeordnet. Die Stadien der Embryogenese beziehen sich auf Campos-Ortega und Hartenstein (1997). amnioproktodäale Invagination (api), Amnioserosa (as), anteriores Mitteldarmprimordium (am), Mesoderm (ms), Mitteldarm (md), Hinterdarm (hd), Labialsegment (lb), Maxillarsegment (mx), posteriores Mitteldarmprimordium (pm), Neuroblasten (nb), Ösophagus (es), posteriore Spirakelöffnung (ps), Proventrikulus (pv), Speicheldrüse (sd), Stomodäum (st), Tracheenplakoden (tp), ventrale Neuroblasten (vnb), Ventralfurche (vf).

1.2 Die Entwicklung polarisierter Epithelien

Epitheliale Gewebe schützen innen liegende Gewebe vor der Außenwelt, indem sie eine selektiv permeable Barriere errichten und so entscheidend zum Erhalt des homöostatischen Gleichgewichtes beitragen (Krämer 2000; Müller, 2000).

In *Drosophila* lassen sich zwei Mechanismen der Entstehung epithelialer Gewebe unterscheiden: Zum einen die de Novo Bildung des Blastodermepithels (siehe 1.1) und ektodermaler Gewebe während der Zellularisierung. Zum anderen die mesenchymale-epitheliale Umwandlung (Umwandlung, engl.: transition) der anterioren und posterioren Mitteldarmanlagen, der Herz-Vorläufer-Zellen und der Gliazellen, die an der Bildung der Blut-Nerven-Schranke beteiligt sind. Man unterscheidet daher auch primäre (de Novo) von sekundären Epithelien (Müller, 2000; Tepass et al., 2001).

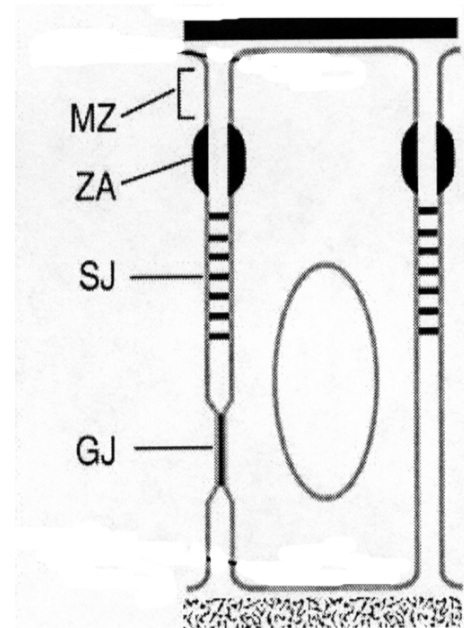
Die Zellularisierung der etwa 5000 embryonalen am Kortex liegenden Blastodermkerne erfolgt synchron. Hierbei werden die Membranen vom Kortex ausgehend lateral an den Kernen vorbei in Richtung Embryoinneres de Novo gebildet. Währenddessen akkumulieren an der lateralen Membran sogenannte „Adherens Junctions“ (AJs), die unmittelbaren Kontakt zu Nachbarzellen herstellen. Basolateral lokalisierte AJs wandern mit der Membran nach innen und lösen sich nach der Zellularisierung auf (Tepass und Hartenstein, 1994). Im Gegensatz hierzu verschmelzen die an der lateralen Membran verbliebenen AJs zu sogenannten „apikalen Spot Adherens Junctions“ (Knust und Bossinger, 2002). Wenn die Kerne komplett von einer Membran umgeben sind, ist die Zellularisierung abgeschlossen. Es haben sich letztendlich polarisierte Zellen gebildet. Neben der lateralen Membran, die als einzige AJs besitzt und im direkten Kontakt zu Nachbarzellen steht, besitzen alle Zellen eine nach außen gerichtete apikale Membran und eine ins Embryoinnere gerichtete basale Membran (Tepass und Hartenstein, 1994; Tepass et al., 2001).

Während der Keimstreifenverlängerung entwickelt sich in ektodermalen und posterioren entodermalen Zellen aus den AJs die Zonula Adherens (ZA), die Zellen wie ein Gürtel umspannt. Die ZA vermittelt Zelladhäsion und steht im festen Kontakt zum apikalen Membranskelett (Knust und Blossinger, 2002). Während ektodermale Zellen ihren polaren Charakter zur Embryogenese und in nachfolgenden Entwicklungsstadien beibehalten, verlieren posteriore Entodermzellen zum Ende der Keimstreifenverlängerung ihre ZA und konvertieren zu apolarem mesenchymalem Gewebe. Im Mesoderm und anterioren Entoderm wird die ZA nicht ausgebildet, die Zellen verlieren bereits zum st8 ihren epithelialen Erscheinungsbild und besitzen einen mesenchymalen Charakter (Tepass und Hartenstein, 1994)

Ektodermale Zellen entwickeln während der späten Embryogenese typischerweise eine gestreckte, zylindrische Form mit drei an der lateralen Membran lokalisierten zellulären Junction-Komplexen: im apikalen Bereich der lateralen Membran befindet sich die ZA, die wiederum basal von den sogenannten „Septate Junctions“(SJs) begrenzt wird. Die SJs unterteilen sich aufgrund der charakteristischen Morphologie ihrer Septa in sogenannte entodermale glatte (smooth; sSJs) und ektodermale gefaltete (pleated; pSJs) Junctions. Die pSJs sind bei elektronenmikroskopischer Betrachtung als eine kontinuierliche leiterförmige Struktur zu erkennen (schematisch angedeutet in Abb.1.2; siehe 1.3). Im basolateralen Membranbereich der Ektodermzellen sind die „Gap Junctions“ (GJs) lokalisiert (Abb.1.2; Tepass und Hartenstein, 1994; Lauf et al., 2002; Tepass et al., 2001).

Abb.1.2: Aufbau der typischen epithelialen ektodermalen Zelle nach der Keimstreifenverkürzung im *Drosophila* Embryo.

Modifizierte schematische Darstellung der typischen späten embryonalen Ektodermzelle (nach Tepass et al., 2001). Die Zellen besitzen eine gestreckte, zylindrische Form und zeichnen sich durch einen polaren epithelialen Charakter aus. Die apikale Seite (oben) weist nach außen und besitzt eine Kutikula (schwarzer Balken), die basale Seite (unten) ist in das Embryoinnere gerichtet. Die Zellen besitzen mehrere komplexbildende zelluläre Junctions und werden entlang der lateralen Membran folgendermaßen aufgeteilt: Nahe der apikalen Membran befindet sich die „Marginale Zone“ (MZ; auch Subapikale-Region SAR genannt). Ihr folgt der erste Junction-Komplex, die Zonula Adherens (ZA). Basal die ZA begrenzend sind die gefalteten (pleated) Septate Junctions“ (pSJs) zu finden. Beide Junction-Komplexe umschnüren die Zellen jeweils in Form eines Gürtels. Im basolateralen Membranbereich bilden sich die GJs aus.



Das Tracheensystem, die Epidermis, der Vorder- und Hinterdarm, die Malpighischen Gefäße, und die Speicheldrüsen sind einschichtige epitheliale Organe ektodermaler Herkunft. Sie deponieren an der apikalen Außenseite eine Kutikula (Abb.1.2. mit schwarzen Balken oben angedeutet) und bilden die oben beschriebene zelluläre Junction Struktur aus (Abb.1.2; Tepass und Hartenstein, 1994; Tepass et al., 2001; Müller, 2003)

Die Amnioserosa ist zwar ebenfalls ektodermaler Herkunft, jedoch bildet sie keine SJs aus und degeneriert im st 16 (Tepass und Hartenstein, 1994).

1.2.1 Genetische Grundlagen der Zellpolarisierung im Blastoderm und Ektoderm

An der Polarisierung epithelialer Zellen sind mehrere Proteinkomplexe beteiligt, die apikal und basal zu den Adherens Junctions an der lateralen Zellmembran lokalisiert sind und sich gegenseitig in ihrer Lokalisation und Aktivität beeinflussen.

Die epitheliale Polarität wird im Blastodermstadium durch Rekrutierung der PDZ-Domänen-Proteine (Psd-95, Discs large, Zo-1; Protein-Protein-Interaktionsdomänen) BAZOOKA (BAZ), *Drosophila melanogaster* PAR-6 (*Dm*PAR-6) und der zytoplasmatischen atypical-Protein-Kinase (aPKC) an den apikalen Kortex initiiert (Kuchinke et al., 1998; Petronczki und Knoblich, 2001; Schober et al., 1999, Wodarz et al., 1999, Wodarz et al., 2000). Die drei Proteine bilden den sogenannten BAZ-Komplex, der apikal überlappend zu den Adherens Junctions lokalisiert ist. Der BAZ-Komplex ist schon während der frühen Gastrulation (st6) für die Stabilität der Adherens Junctions wichtig (Müller und Wieschaus, 1996, Petronczki und Knoblich, 2001; Wodarz et al., 2000).

Ein weiterer Proteinkomplex besteht aus dem Transmembran-(TM)-Protein CRUMBS (CRB) und den beiden PDZ-Domänen-Proteinen STARDUST (SDT; Bachmann et al., 2000; Tepass, 1996; Tepass und Knust, 1993; Tepass et al., 1990) und DISCS LOST (DLT; Bhat et al., 1999). Dieser Komplex, auch als CRB-Komplex bezeichnet, wird abhängig vom BAZ-Komplex apikal zu den AJ lokalisiert (Bilder et al., 2003; Tanentzapf und Tepass, 2003). Eine Mislokalisierung apikaler Proteine ist in *crb*, *sdt* und *dlt* mutanten Embryonen erst nach der Gastrulation ab st8 zu beobachten, daher scheinen ihre Genprodukte am Erhalt der apikalen Polarität beteiligt zu sein (Bilder et al., 2003; Grawe et al., 1996; Tepass, 1996).

Die beiden PDZ-Domänen-Proteine SCRIBBLE (SCRIB) und DISCS LARGE (DLG) bilden ebenfalls einen Proteinkomplex (Bilder et al., 2000), der jedoch die Adherens Junctions basolateral begrenzt (Bilder und Perrimon, 2000; Woods et al., 1996). Der SCRIB/DLG-Komplex besitzt nach der Gastrulation (ab st8) eine antagonistische Wirkung auf die apikale Aktivität des BAZ- und CRB-Komplexes (Bilder et al., 2003). In *scrib* und *dlg* mutanten Embryonen kommt es zur basolateralen Mislokalisierung apikaler Proteine (Bilder und Perrimon, 2000; Bilder et al., 2003).

In Bezug auf spätembryonale ektodermale Zellen sind die Komponenten des BAZ- und CRB-Komplexes, mit Ausnahme von DLT, exklusiv im Bereich der sogenannten Marginalen Zone (MZ, auch Subapikale-Region SAR bezeichnet; Müller, 2003; Abb.1.2; Tabelle.1.1) lokalisiert, während DLG und SCRIB spezifisch in den sich bildenden SJs zu finden sind (siehe 1.3.1; Abb.1.2; Tabelle.1.1).

Die oben beschriebenen Proteinkomplexe bewirken eine apikal und basale Eingrenzung der AJs. Die AJs, die hauptsächlich aus Zelladhäsionsproteinen, wie den Cateninen und Cadherinen (Oda et al., 1993; Tepass, 1996; Tepass et al., 2001 Uemura et al., 1996) bestehen, spielen ebenfalls für die Polarität eine wichtige Rolle. Zerstört man die AJs, so kommt es zur Mislokalisierung apikaler Proteine (Bilder et al., 2003)

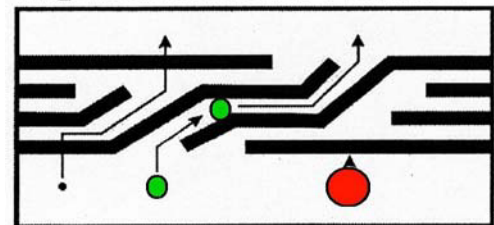
1.3 Die Bildung von Septate Junctions in ektodermalen Zellen

Die SJs erscheinen erst nachdem die Polarität festgelegt und die Zonula Adherens aus ihren Vorläufern den Adherens Junctions gebildet wurde. Zum Ende der Embryogenese sind die SJs vollständig ausgebildet und werden aufgrund ihrer elektronenmikroskopischen Struktur in gefaltete, ektodermale pSJs und glatte, meist entodermale sSJs aufgeteilt (siehe 1.2; Tepass und Hartenstein, 1994; Tepass et al., 2001).

Die pSJs zeichnen sich durch parallel angeordnete Septa aus (Noirot-Timothee und Noirot, 1980). Die Septa, die wahrscheinlich von Transmembran-(TM)-Proteinen gebildet werden, winden sich wie ein Schraubengewinde um die Zellen herum (Tepass et al., 2001). Die Septa vermitteln direkten Zellmembrankontakt benachbarter Zellen, indem sich die extrazellulären Bereiche der Septa benachbarter Zellen verbinden und so extrazelluläre Diffusionswege entstehen (Aschenbrenner und Walz, 1998). Diese Diffusionswege sind von der optimalen Anordnung und Anzahl der Septa abhängig und verlängern so den Weg für Moleküle (Tepass et al., 2001). Die in ihrer Beschaffenheit variierenden Diffusionswege können unterschiedlich effiziente Barrieren ausbilden (Abb.1.3; Aschenbrenner und Walz, 1998). In *Drosophila* stellen die Septa der pSJs eine die Zellen umgebende segeltuchförmige feine Struktur dar (Tepass et al., 2001). Bis zu welcher Größe kleine Moleküle oder aber Ionen die Barriere durchdringen können ist nicht bekannt. Tatsächlich sind jedoch die Septa für den Aufbau und/oder den Erhalt transepithelialer Barrieren notwendig. So geht der Verlust der Septa-Struktur mit dem Verlust der Blut-Nerven-Hirn-Schranke (Baumgartner et al., 1996; siehe 1.3.1) und der transepithelialen Barriere einher (Lamb et al., 1998; Ward et al., 1998; siehe 1.3.1). Neben der Barrierefunktion sind die pSJs außerdem am Erhalt der Zellpolarität (Bilder et al., 2003), der Determination, der Zellform (Ward et al., 2001) und der Zellproliferation beteiligt (Bilder und Perrimon, 2000; Woods et al., 1996).

Abb.1.3: Schematische Darstellung unterschiedlicher pSJ Barrieretypen. Idealisierte Darstellung, wie SJs eine transepitheliale Barriere innerhalb eines interzellulären Raumes aufbauen können (modifiziert nach Aschenbrenner und Walz 1998). Die SJs bilden eine irrgarten-ähnliche Barriere. Hierbei orientiert sich die Selektivität der Barriere an der Länge und der Anzahl der Diffusionswege, die wiederum durch die Septa benachbarter Zellen gebildet werden. So können „grobe“ Barrieren mit kurzen Diffusionswegen und „feine“ Barrieren mit sehr langen Diffusionswegen entstehen. Bei „feinen“ Barrieren umspannen die SJs segeltuchartig die Zellen, so dass nur kleine Moleküle oder Ionen über parazelluläre Wege die Barriere passieren.

Irrgarten-ähnliche Barriere



- durchdringen Diffusionswege und Septa
- durchdringen nur Diffusionswege
- kein durchdringen der Barriere möglich

1.3.1 Molekulare Faktoren der Septate Junctions

Nur wenige Komponenten der SJs sind bisher bekannt. So sind SCRIB und DLG (siehe 1.3.1) während der späteren embryonalen Entwicklung vermutlich über ihre PDZ-Domänen mit TM-Proteinen an die SJs assoziiert (Bilder et al., 2000; Woods et al., 1996) und an der Ausbildung der Septa-Struktur beteiligt (Bilder et al., 2003). Darüber hinaus besitzen beide Proteine Funktionen bei der dorsalen Schließung des Embryos, sowie an der Kutikulaverteilung und bei der larvalen Proliferation von Imaginalscheibenzellen (Bilder et al., 2000).

Das integrale TM-Protein NEUREXIN (NRX) wird ausschließlich in ektodermalen Geweben, wie dem Tracheensystem, dem Vorder- und Hinterdarm, der Epidermis, den Speicheldrüsen, im peripheren Nervensystem, den chorduotonalen Organen und in Gliazellen entlang der embryonalen ventralen Mittellinie exprimiert (Baumgartner et al., 1996). NRX ist spezifisch in den pSJs lokalisiert und notwendig für deren leiterförmige Septa-Struktur (Baumgartner et al., 1996). In pSJs von peripheren und subperineuralen Gliazellen scheint NRX für die Blut-Nerven-Hirn-Schranke wichtig zu sein (Baumgartner et al., 1996). NRX interagiert mit dem zytoplasmatischen Protein CORACLE (COR), das zur Familie der 4.1 Proteine gehört und wie NRX spezifisch in den ektodermalen pSJs lokalisiert ist (Fehon et al., 1994; Ward et al., 1998). COR ist für leiterförmigen Septa-Struktur der pSJs und für die der transepithelialen Barriere essentiell (Lamb et al., 1998; Ward et al., 2001).

Die Interaktion von NRX mit COR wurde sowohl über genetische als auch biochemische Studien bestätigt. So ist COR in *nrx* mutanten Embryonen, entlang der basolateralen Zellmembran mislokalisiert (Ward et al., 1998). Ebenso ist NRX in *cor* mutanten Embryonen basolateral fehlplatziert. Es wird vermutet, dass das TM-Protein NRX für die korrekte Lokalisierung des zytoplasmatischen COR Proteins an die pSJs verantwortlich ist und anschließend wiederum COR für den Erhalt der NRX Lokalisation in den pSJs wichtig zu sein scheint (Ward et al., 1998). Biochemische Studien zeigen, dass die ersten 383 Aminosäuren der N-terminalen Region von COR für eine Bindung an NRX ausreichen (Ward et al., 1998; Ward et al., 2001). Die Sequenz des N-terminalen Bereichs von COR ist innerhalb der 4.1-Proteinfamilie (Hoover und Bryant, 2000) konserviert und wird auch als FERM-Domäne (Protein-4.1, EZRIN, RADIXIN und MEOSIN) bezeichnet. Die COR Bindung erfolgt vermutlich über ein konserviertes putatives FERM-Domänen-Binde-Motiv (Littleton et al., 1997) der C-terminalen intrazellulären Domäne von NRX. Außerdem besitzt NRX am C-terminalen Ende ein putatives PDZ-Binde-Motiv der Klasse 2, das Interaktionen mit PDZ-Domänen-Proteinen (siehe 1.2.1) oder sogenannten MAGUK-Proteinen (Membran assoziierten Guanylat Kinasen; Littleton et al., 1997; Sheng et al., 2000; Songyang et al., 1997) ermöglicht. Über eine gezielte Suche mit dem NRX C-Terminus wurde tatsächlich das

PDZ-Domänen Protein DLT als Interaktionspartner identifiziert (siehe 1.2.1; Bhat et al., 1999).

NRX und COR sind vermutlich auch an der Zellformgebung beteiligt. So sind in *nrx* mutanten Embryonen untypisch abgerundete chorduotonale Scolopidealzellen vorhanden (Baumgartner et al., 1996). In *cor* Mutanten ist eine Zellformveränderung der Ommatidien beobachtet worden (Lamb et al., 1998). Außerdem wurden fehlerhafte dorsale Epidermisschließungen bei *nrx* und *cor* mutanten Embryonen beobachtet, die ebenfalls Zellformveränderungen vermuten lassen (Baumgartner et al., 1996; Lamb et al., 1998). In *cor* Embryomutanten sind zusätzliche epidermale Phänotypen bekannt. So scheinen die Zähnchenbänder weniger stark ausgeformt zu sein, und die Kutikula löst sich zum Teil vom Embryo ab (Lamb et al., 1998).

FASCICLIN3 (FAS3) ist ein Zelladhäsion vermittelndes TM-Protein (Patel et al., 1987; Snow et al., 1989), das ebenfalls in den SJs lokalisiert ist (Woods et al., 1997). Doch weder FAS3, noch NRX oder COR sind an der Ausbildung der epithelialen Zellpolarität beteiligt.

Membran-Domäne	Proteine	Charakteristika
Margianle Zone:		
BAZ-Komplex:	BAZ; <i>Dm</i> PAR6; DaPKC	PDZ-Domänen-Proteine; Protein-Kinase
CRB-Komplex:	CRB; SDT; DLT	TM-Protein; MAGUK-Protein; PDZ-Domänen-Protein
Zonula Adherens		
Cadherine-Catenin-Komplex	Cadherine (z.B. SHG) Catenine (z.B. ARM)	Cadherin-Catenin-Adhäsionskomplex
Septate Junctions		
SRIB-DLG-Komplex	SCRIB; DLG	PDZ-Domänen-Proteine, MAGUK-Protein
NRX-COR-Komplex	NRX; COR	TM-Protein; 4.1-Protein

Tabelle.1.1: Die apikolateralen Regionen ektodermaler Zellen besitzen unterschiedliche Proteinkomplexe.

Apikal in der Marginalen Zone sind die beiden Proteinkomplexe BAZOOKA (BAZ), *Drosophila melanogaster* PAR6 (*Dm*PAR6), atypical-Protein-KinaseC und CRUMBS (CRB), STARDUST (SDT), DISCS LOST (DLT) lokalisiert. In der Zonula Adherens sind die Cadherine-Catenin-Komplexe zu finden, in *Drosophila* bestehend aus z.B. SHOTGUN (SHG; Epitheliales-Cadherin) und ARMADILLO (ARM, β -Catenin Homolog). In den Septate Junctions sind die DISCS-LARGE (DLG) - SCRIBBLE (SCRIB) und NEUREXIN (NRX) - CORACLE (COR) Proteinkomplexe lokalisiert.

1.4 Das Tracheensystem als Modellsystem polarisierter epithelialer Gewebe

Das *Drosophila* Tracheensystem besteht aus einem stereotypen drei-dimensionalen Netzwerk tubulärer Äste. Die Tracheenzellen sind ektodermaler, epidermaler Herkunft und besitzen eine polarisierte, epitheliale Form (Manning und Krasnow, 1993). Sie besitzen außerdem eine Anordnung ihrer Junction-Komplexe, wie sie auch in anderen ektodermalen Epithelien zu finden ist (siehe 1.2; Tepass und Hartenstein, 1994).

Die eigentliche Funktion des Tracheensystems ist der Gastransport über die Spirakelöffnungen direkt zu den Zielgeweben im Körperinneren (Manning und Krasnow, 1993). Hierbei versorgt das Tracheensystem den Organismus mit Sauerstoff und bewirkt den Abtransport von Kohlendioxid (Wigglesworth, 1972; Chapman, 1982). Bisher wurde bei dem Gasaustausch ausschließlich von einer passiven Diffusion ausgegangen (Weis-Fogh, 1964). Neuste Erkenntnisse demonstrieren jedoch einen aktiven respiratorischen Mechanismus (an Käfer, Grillen, Ameisen und anderen Insekten entdeckt), bei dem die trachealen Äste vermutlich mittels Muskelkraft zusammengedrückt werden. Sind hierbei die Spirakelöffnungen geschlossen, baut sich ein innerer Druck auf, der den Sauerstoff-Diffusions-Gradienten zwischen Tracheolen (Endbereich der Tracheenlumina) und Zielgeweben erheblich steigert (Westneat, 2003).

1.4.1 Die frühe embryonale Entwicklung des Tracheensystems

Das Tracheensystem entwickelt sich erst in der zweiten Hälfte der Embryogenese. Kurz vor Ende der Keimstreifenverkürzung (siehe 1.1; st10), liegen die Tracheenzellen in Form von Zellhaufen, den sogenannten Tracheenplakoden vor. Ein Embryo besitzt auf jeder Seite 10 Plakoden, die sich an der lateralen Epidermis vom zweiten thorakalen (T2) bis zum achten abdominalen (A8) Segment erstrecken (Abb.1.4,A; Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Während der Entwicklung des Tracheensystems findet keine Zellteilung statt, die Plakoden bestehen aus ca. 90 Zellen (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997; Manning und Krasnow, 1993).

Die Tracheenzellen invaginieren in das Mesoderm unter Bildung der trachealen Gruben, die als ektodermale Einstülpung elektronenmikroskopisch zu erkennen sind (Turner und Mahowald, 1977; Fullilove und Jakobsen, 1978). Die Invagination geht einher mit einem stereotypen fingerartigen Auswachsen der mehrzelligen primären Hauptäste und der in ihnen entstehenden tubulären Struktur. Bis zum st12 haben sich die (anterioren und posterioren) dorsalen Hauptstammäste, die dorsalen Äste, die viszerale Äste (mit Ausnahme von Metamer 3 und 9) und die (anterioren und posterioren) lateralen Hauptstämme gebildet (Abb.1.4,B). Zum Ende der Keimstreifenverkürzung (Ende st13) bilden die aufeinander

zugewachsenen dorsalen Hauptstammäste benachbarter Metamere einen durchgehenden dorsalen Hauptstamm pro Embryohemisphäre aus (Abb.1.4,C). Die dorsalen Hauptstämme besitzen ein durchgehendes Lumen und vernetzen die Tracheenmetamere miteinander (Manning und Krasnow, 1993).

1.4.2 Die späte embryonale Entwicklung des Tracheensystems

Im Verlauf der späten embryonalen Tracheenentwicklung (st14-17) kommt es zur Fusion verschiedener Äste und damit zur dreidimensionalen Vernetzung des gesamten Tracheensystems (Abb.1.4,D). Die dorsalen Äste wachsen in dorsaler Richtung aus, wo sie mit den dorsalen Ästen der anderen Hemisphäre unter Bildung der 10 dorsalen Anastomosen fusionieren. Eine elfte dorsale Anastomose wird durch die beiden auf jeder Seite nach dorsal auswachsenden Gehirn-Äste ausgebildet. Ebenso wachsen nach ventral die ganglionischen Verlängerung aus, von denen drei mit den ganglionischen Verlängerungen der anderen Embryoseite fusionieren, so dass die ventralen Anastomosen entstehen. Außerdem fusionieren die lateralen Äste benachbarter Metamere zu einem durchgehenden lateralen Stamm (Manning und Krasnow, 1993).

Neben der Vernetzung kommt es zur Ausbildung sogenannter sekundärer und terminaler Äste. Im Gegensatz zu den primären Ästen bestehen sie jeweils aus einer einzelnen Zelle (Samakovlis et al., 1996). Bei den sekundären Ästen rollt sich eine einzelne Zelle zusammen, so dass es zum Verschluss der beiden Enden durch autozelluläre Junctions kommt und damit zur Bildung eines extrazellulären Lumens. Für die Entstehung der Terminalen Äste bilden Zellen ein zytoplasmatisches Lumen aus (Lubarsky und Krasnow, 2003). Am Endbereich der terminalen Äste findet schließlich der Sauerstoff-Austausch mit den Zielgeweben statt.

Während der späten Tracheenentwicklung kommt es zu einer drastischen Vergrößerung des Lumens der dorsalen Hauptstämme (Beitel und Krasnow, 2000). Zum Ende der Embryogenese wird das Kutikula-Material in das Tracheenlumen transportiert (st15-16), so dass eine vollständige, lauftundurchlässige Kutikula die Zellen umgibt und sie vom Lumen abgrenzt (Manning und Krasnow, 1993; Fisk und Thurnmel, 1998). Etwa drei Stunden vor dem Schlüpfen der Larve füllen sich die Tracheenlumina mit Luft, so dass nach dem Schlüpfen der Larve ein Gasaustausch mit der Umwelt stattfinden kann (Manning und Krasnow, 1993).

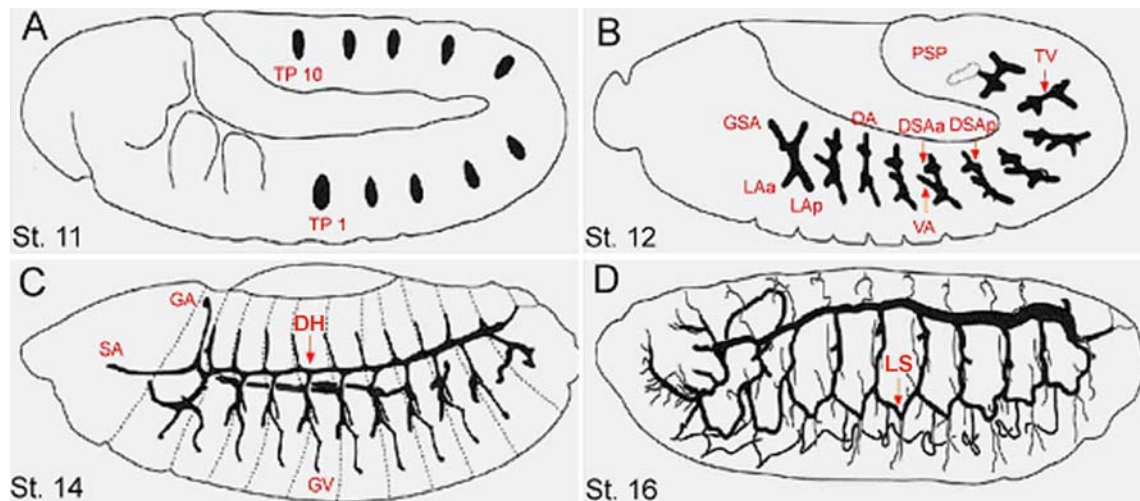


Abb.1.4.: Schematische Darstellung der embryonalen Tracheenentwicklung von *Drosophila*. Modifizierte Darstellung der trachealen Entwicklung nach Manning und Krasnow, 1993. **(A):** Zum Beginn der trachealen Entwicklung bilden die Tracheenzellen pro Hemisphäre die 10 sogenannten Tracheenplakoden (TP). **(B):** Mit der Invagination der ektodermalen Zellen von der Epidermis in das darunter liegende Mesoderm, beginnen die primären Tracheenäste fingerartig auszuwachsen. **(C):** Zum Ende Keimstreifenverkürzung hat sich durch Fusion benachbarter Äste ein kontinuierlicher dorsaler Hauptstamm ausgebildet. **(D):** Kurz vor Ende der trachealen Entwicklung haben sich durch Fusion auch der laterale Hauptstamm und die dorsalen bzw. ventralen Anastomosen ausgebildet. Es kommt so zur vollständigen Vernetzung der Tracheensysteme beider Embryoseiten. Dorsaler Ast (DA), dorsaler Hauptstamm (DH), dorsaler Stammast anterior (DSAa), dorsaler Stammast posterior (DSAp), Ganglionische Verlängerung (GA), Gehirn Ast (GA), Gehirn-Schlund-Ast (GSA), lateraler Ast anterior (LAa), lateraler Ast posterior (LAp), lateraler Stamm (LS), Schlund Ast (SA), Tracheenplakode (TP), transversale Verbindung (TV), viszeraler Ast (VA), posteriores Spirakel (PSP).

1.4.3 Mechanismen der stereotypen Tracheenentwicklung

Aus 20 Zellhaufen entwickelt sich durch zielgerichtetes Auswachsen verschiedener Äste ein komplexes dreidimensionales Röhrensystem. Das System besitzt trotz seiner Komplexität einen stereotypen Aufbau. Hierbei sind Mechanismen beteiligt, die die Position der einzelnen Zellen determinieren und damit die Zellverbandszugehörigkeit zu einem bestimmten sich später entwickelnden Ast gewährleisten (Affolter und Shilo, 2000). Des weiteren wird ein gerichtetes Auswachsen der Zellen durch Mechanismen außerhalb des Tracheensystems hervorgerufen (Boube et al., 2001; Franch-Marro und Casanova, 2000; Metzger und Krasnow, 1999; Wolf und Schuh, 2000).

Generelle Tracheenzelldeterminierung: Epidermale Zellen erhalten durch die Transkriptionsfaktoren TRACHEALESS (TRH) und DRIFTER (DFR) die generelle Determinierung zu Tracheenzellen (Anderson et al., 1995; de Celis et al., 1995; Isaac und Andrew, 1996; Wilk et al., 1996). In *trh* Embryomutanten wird kein Tracheensystem bzw. in *dfr* nur ein rudimentäres angelegt (Isaac und Andrew, 1996; Wilk et al., 1996). TRH und DFR heterodimerisieren (Zelzer und Shilo, 2000) und regulieren die Expression vieler

Tracheengene (Llimargas und Casanova, 1997; Boube et al., 2000). Zu diesem frühen Zeitabschnitt der trachealen Entwicklung spielen die Transkriptionsfaktoren SPALT (SAL) und TRACHEA DEFECTIVE (TDF) eine wichtige Rolle. SAL determiniert die anteriore bzw. posteriore Grenze des späteren Tracheensystems, indem es die Tracheenentwicklung in den Terminalbereichen unterdrückt. In *sal* Embryomutanten entstehen ektopische tracheale Metamere (Kühnlein et al., 1996). TDF wiederum scheint den Tracheenzellen die Kompetenz zum Auswandern an sich zu geben, da in *tdf* mutanten Embryonen kein Auswachsen der Äste stattfindet (Eulenberg und Schuh, 1997).

Positions determinierung: Die Positionsbestimmung der Tracheenzellen innerhalb der Plakode erfolgt in Abhängigkeit der Liganden *D*-TGF β („transformierender Wachstumsfaktor“; Vincent et al. 1997), *D*-EGF („epidermaler Wachstumsfaktor“; Gabay et al., 1997 Wappner et al., 1997), WINGLESS (Chihara und Hayashi, 2000; Llimargas 2000) und HEDGEHOG (Glazer und Shilo, 2001), die über Signalkaskaden in unterschiedlichen Bereichen der Tracheenplakoden ihre Zielgene kontrollieren. Mit *knirps* (*kni*) und *sal* wurden bereits zwei Zielgene identifiziert. Der Transkriptionsfaktor KNI, vermittelt dorso-ventrales Auswachsen der Tracheenzellen. KNI wird durch den *D*-TGF β /DPP-Gradient kontrolliert (Chen et al., 1998; Vincent et al, 1997). Das anteriore-posteriore Auswachsen der dorsalen Hauptstämme wird durch SAL beeinflusst, das unter der Kontrolle des WINGLESS-Signalwegs steht (Chihara und Hayashi, 2000).

Regulation des gerichteten Auswachsens primärer Äste: Das gerichtete Auswachsen der Tracheenäste wird schließlich durch unterschiedliche Strategien und Faktoren außerhalb des Systems gesteuert. So wird der *D*-FGF– (Fibroblasten Wachstumsfaktor) Ligand BRANCHLESS (BNL) in jeweils 6 kleinen Zellhaufen nahe den Tracheenplakoden exprimiert (Sutherland et al., 1996) und bewirkt, dass die Tracheenzellen zur höchsten BNL Konzentration hinwachsen. Ein weiteres Beispiel ist das Auswachsen der viszerale Äste. Die viszerale Äste wachsen zwar mit Hilfe von BNL bis an das viszerale Mesoderm heran, benötigen dann aber die Hilfe des Adhäsionsmoleküls PS2, einem Integrin, das auf der Zelloberfläche viszerale Mesodermzellen lokalisiert ist, um weiter wachsen zu können. Der Kontakt zu einem ähnlichen Adhäsionsmolekül PS1, ein weiteres Integrin, das wiederum spezifisch auf der Oberfläche der Tracheenzellen präsent ist, scheint hierbei essentiell zu sein (Boube et al., 2001). Eine ganz anderer Mechanismus des gerichteten Auswachsens von Tracheenästen wird bei der Bildung der dorsalen Hauptstämme verwirklicht. Die dorsalen Hauptstämme sind die wichtigsten Äste im Tracheensystem, weil sie mit ihrem großen Lumen alle Tracheenmetamere vernetzen und über die Spirakelöffnungen direkten Kontakt nach außen besitzen (Manning und Krasnow, 1993). Ein Überleben ohne die dorsalen Hauptstämme ist für Larven nicht möglich (Kühnlein et al., 1996). Daher besitzen dorsale Hauptstämme neben der BNL induzierten Informationen ein zweites System, das ein

präzises Auswachsen kontrolliert. 2,5 Stunden vor der Fusionierung eines dorsalen Hauptstammes ermöglicht eine einzelne mesodermale Zelle das gerichtete Auswachsen der posterioren und anterioren dorsalen Hauptstammäste. Beim Verlust dieser Zelle, der sogenannten Brückenzelle, werden keine kontinuierlichen dorsalen Hauptstämme gebildet. Die Spitzenzellen benachbarter dorsale Stämme können ohne Brückenzelle in den meisten Fällen nicht zueinander finden (Wolf und Schuh, 2000). Die Brückenzelle dient hierbei vermutlich als eine Art Matrix für FGF induzierte tracheale Zellausläufer (Wolf et al., 2002).

Regulation des Auswachsens sekundärer und terminaler Äste: Auch das Auswachsen sekundärer Äste erfolgt nach einem stereotypen Muster und wird ebenfalls durch den FGF-Signalweg kontrolliert (Sutherland et al., 1996). Während in *bnl* Embryomutanten keine sekundären Äste zu finden sind, können durch ektopische Expression von FGF/BNL sekundäre Äste induziert werden (Sutherland et al., 1996). Das Auswachsen der terminalen Äste, die letztendlich für den Gasaustausch mit Zielgeweben verantwortlich sind, unterliegt im Embryo ebenfalls dem FGF-Signalweg (Sutherland et al., 1996). Die terminalen Äste bilden viele feine Verzweigungen, die in das Zielgewebe hineinreichen. Im Unterschied zur genetisch kontrollierten Entwicklung primärer und sekundärer Äste unterliegt die Ausbildung terminaler Äste einem dynamische Prozess, der von der Sauerstoffversorgung der Zielgewebe abhängt (Jarecki et al., 1999).

1.5 Mechanismen der tubulären Morphogenese

Die Bildung epithelialer tubulärer Strukturen erfolgt über unterschiedliche Mechanismen. Die polarisierten, epithelialen Zellen der Speicheldrüsen nehmen eine zylindrische Form an, bilden eine Plakode und diese invaginiert, um ein Lumen zu bilden (Abb.1.5,A; Hogan und Kolodziej, 2002). Dagegen wachsen im Tracheensystem aus der Plakode fingerartig primäre Äste aus (siehe 1.4.1). Die Entstehung primärer Äste und ihrer Lumina erfolgt dabei durch Ausknospung (engl.: budding). Hierbei findet eine Knospung neuer Äste und Lumina aus schon bestehenden Ästen statt (Abb.1.5,B; Lubarsky und Krasnow, 2003). Bei dem anschließenden Auswachsen und der Vernetzung müssen tubuläre Äste und ihre Lumina eine definierte Länge und Durchmesser einnehmen. Beitel und Krasnow (2000) fanden erste Hinweise, dass die apikale, dem Lumen zugewandte; Zellseite von entscheidender Bedeutung für die Astmorphogenese ist: Im Gegensatz zur basalen Seite unterliegt die apikale Seite offensichtlich einem hohem Maß an Kontrolle, da sie während der Lumenerweiterung der dorsalen Hauptstämme (st14-16) kontinuierlich weiterentwickelt wird. Nur die apikale Seite verändert ihre Position innerhalb der Äste und bedingt so eine Vergrößerung des inneren Durchmessers der Röhren, während sich die basale Seite und somit der äußere Durchmesser nicht verändert (Abb.1.5,C; Beitel und Krasnow, 2000).

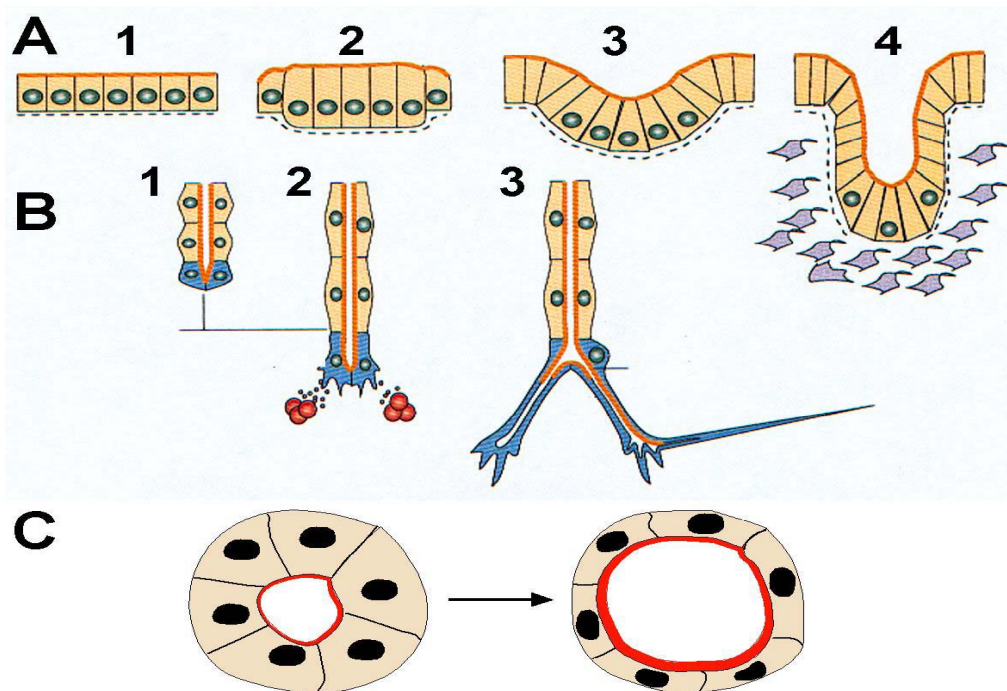


Abb.1.5: Schematische Darstellung der Morphogenese tubulärer Strukturen. In A und B sind modifizierte schematische Darstellungen zweier unterschiedlicher Mechanismen der Ausbildung tubulärer Strukturen gezeigt (nach Hogan und Kolodziej, 2002). **(A):** Die tubuläre Struktur der Speicheldrüsen entsteht durch Invagination. Epitheliale polarisierte Zellen (1) nehmen eine zylindrische Form an (2) und bilden hierbei ein Plakode, die zu invaginieren beginnt (3), um schließlich eine tubuläre Form mit einem Lumen auszubilden (4). **(B):** Die polarisierten primären Äste des Tracheensystems entstehen durch Ausknospung und anschließender Extension mehrerer Zellen (1). Hierbei folgen die distalen Spitzenzellen einer chemoattraktiven Quelle (mesodermale Zellen in rot) außerhalb des Tracheensystems (2). Nach dem gerichteten Auswachsen der primären Äste, elongieren die Spitzenzellen, um sekundäre und terminale Äste bilden zu können (3). **(C):** Schematisch dargestellter Querschnitt eines dorsalen Hauptstammes (DH). Nach der Fusion besitzt der DH ein kontinuierlich ausgebildetes Lumen mit einem kleinen Durchmesser (links, st14). Innerhalb weniger Stunden kommt es zur Erweiterung des Lumendurchmessers, obwohl der Gesamtdurchmesser des Astes gleich bleibt (rechts, st16). Hierfür kommt es zur Verringerung der Zelldicke, indem die apikale (innen, dem Lumen zugewandte) Seite sich stetig in Richtung basal (nach außen) bewegt. Die basale Seite verändert ihre Position jedoch nicht.

Des weiteren konnten Beitel und Krasnow (2000) acht verschiedene Gene identifizieren, die an der tubulären Morphogenese der Tracheen beteiligt sind. In Embryomutanten (st15) von *megatrachea*, *sinuous*, *bulbous*, *varicose*, *ectatic*, *gnarled*, *convoluted* und *cystic* wurde ein bisher unbekannter wellenförmiger Tracheenphänotyp beobachtet, der auf eine Verlängerung der dorsalen Hauptstämme von bis zu 37% (bei *megatrachea*) zurückzuführen ist. Zusätzlich wurden fehlerhafte Lumendurchmesser einzelner Äste beobachtet. Eine molekulare Analyse der betroffenen Gene fand jedoch nicht statt. Die Autoren überprüften anschließend, ob eine größere Astlänge von einer erhöhten Anzahl trachealer Zellen abhängig sein kann, was jedoch ausgeschlossen werden konnte. So wurde beobachtet, dass trotz geringerer Tracheenzellanzahl in *cyclinA* mutanten Embryonen ein normal entwickeltes

Wildtyp (WT)-ähnliches Tracheensystem gebildet wird. In *dacapo* mutanten Embryonen dagegen findet annähernd eine Verdopplung der Anzahl trachealer Zellen statt, aber auch hier ist die Tracheenmorphologie unverändert im Vergleich zum WT. Die beobachteten wellenförmigen Tracheenphänotypen konnten also nicht einer Veränderung der trachealen Zellanzahl entstammen. Darüber hinaus wird vermutet, dass auch die allgemeine Zellform keine Veränderungen der trachealen Morphologie hervorrufen. Gestützt wird dies zum einen durch die Annahme, dass eine veränderte Zellanzahl mit einer veränderten Zellform einhergehen muss, um wie bei *cyclinA* und *dacapo* mutanten Embryonen ein WT-ähnliches Tracheensystem zu bilden. Zum anderen zeigt der Vergleich distaler Spitzenzellen, dass diese trotz gleicher Zellform in verschiedenen Ästen Lumina mit unterschiedlichen Durchmessers ausbilden (Beitel und Krasnow, 2000).

Neuste Erkenntnisse, deuten auf eine Zellformveränderung als Ursache für veränderte Astlängen und Lumendurchmesser hin. In Embryomutanten von *grainy head* (*grh*), das einen Transkriptionsfaktor kodiert, wurde eine Verlängerung des DH von durchschnittlich ca. 40% gemessen, während der Durchmesser unverändert blieb. Untersuchungen auf zellulärer Ebene zeigen eine Vergrößerung der apikalen Zellmembran. Ein entgegengesetzter Effekt wird durch die Überexpression von *grh* im Tracheensystem erzielt. Die Äste folgen zwar dem stereotypen Muster des Auswachsens (siehe 1.4.3), bilden jedoch nicht ihre volle Länge aus (Hemphälä et al., 2003). Entgegen der ursprünglichen Beobachtungen von Beitel und Krasnow scheint jedoch neben der apikalen auch die laterale und basolaterale Zellmembran an der Astmorphogenese beteiligt zu sein. Das Zelladhäsionsprotein FASCICLIN2 (FAS2) und die $\text{Na}^+/\text{K}^{2+}$ -transportierende ATPase α -Untereinheit sind in der lateralen Membran trachealer Zellen lokalisiert. In mutanten Embryonen beider Gene ist sowohl eine Verlängerung der Äste, als auch eine Veränderung ihrer Durchmesser beobachtet worden. Interessanterweise scheint in Embryomutanten der ATPase die Septa-Struktur der pSJs (siehe 1.3) reduziert zu sein (Hemphälä et al., 2003).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden erste Einblicke in zelluläre und molekulare Mechanismen gewonnen, die eine Morphogenese tubulärer Strukturen kontrollieren. Es konnten zwei Gene, *megatrachea* und *wurst*, identifiziert werden, die über die Tracheenzellform die Länge trachealer Äste beeinflussen. MEGTRACHEA ist ein TM-Protein das an Ausbildung der pSJs beteiligt ist. WURST, ebenfalls ein TM-Protein, ist neben der Astmorphogenese auch für die Gasfüllung und die Lokalisation eines trachealen Lumenmarkers notwendig.

2 Ergebnisse

Das embryonale Tracheensystem von *Drosophila melanogaster*, ist eine dreidimensionale, tubuläre Struktur, dessen Äste anhand eines stereotypen Musters auswachsen und vernetzt werden. Zum Ende der Embryogenese ist das Tracheensystem vollständig ausgebildet und übernimmt mit dem Eintritt in das erste Larvenstadium seine vorhergesehene Funktion, Sauerstoff in die umliegenden Organe und Zielgewebe zu transportieren (Manning und Krasnow, 1993). Im Laufe der letzten 10 Jahre konnte die Beteiligung vieler unterschiedlicher Signalwege und Mechanismen an dem gerichteten Auswachsen und der Fusion trachealer Äste gezeigt werden (Affolter und Shilo, 2000). Im Gegensatz hierzu sind die Mechanismen, die an der Tracheenmorphogenese beteiligt sind, fast völlig unbekannt. Was kontrolliert und definiert z.B. die Länge der Äste oder den Durchmesser der Astlumina? Vor zwei Jahren wurden das erste Mal Fliegenlinien identifiziert, deren mutante Embryonen veränderte Astlängen und / oder Lumendurchmesser besitzen (Beitel und Krasnow, 2000). Keine der Linien wurde bisher jedoch molekular analysiert.

2.1 Detektion von Gene, die an der trachealen Morphogenese beteiligt sind

2.1.1 Durchmusterung letaler P-mutanter Embryonen auf tracheale Defekte

Vor ca. 3 Jahren wurden in unserer Abteilung 501 letale und ausschließlich auf dem ersten (X)-Chromosom lokalisierte P-Transposon Insertionslinien generiert (Peter et al., 2002). Um die 501 P-Linien auf tracheale Defekte in Embryomutanten durchsuchen zu können, wurden die embryonalen Tracheenäste mit Hilfe des 2A12 Antikörpers, der gegen ein unbekanntes Lumenantigen gerichtet ist, sichtbar gemacht. Aufgrund der Durchmusterung sind 75 P-Insertionslinien mit starken trachealen Defekten in mutanten Embryonen identifiziert worden. Diese 75 P-Linien wurden anhand ihrer mutanten trachealen Erscheinungsbilder in vier phänotypische Gruppen geordnet. In WT Embryonen entstehen von posterior nach anterior kontinuierlich ausgebildete dorsale Hauptstämme. In mutanten Embryonen der ersten phänotypischen Gruppe hingegen sind nur diskontinuierlich ausgebildete dorsale Hauptstämme zu beobachten. Scheinbar können die dorsalen Äste der benachbarten Tracheenmetamere nicht immer fusionieren. Mutante Embryonen der zweiten Gruppe besitzen ebenfalls nur diskontinuierlich ausgebildete dorsale Hauptstämme, zusätzlich sind aber auch die ventralen Tracheenäste korkenzieherförmig ausgebildet. Normalerweise erstrecken sich ventrale Äste im WT gerade von dorsal nach ventral. Die Embryonen der dritten Gruppe besitzen starke tracheale Fusionsdefekte der dorsalen und lateralen Hauptäste. Die Äste wachsen aus, können jedoch oftmals nicht mit ihrem benachbarten

Partner fusionieren. Bei Embryonen der vierten Gruppe wachsen die dorsalen und lateralen Hauptäste nicht aus (Behr, 1999).

Die trachealen Erscheinungsbilder mutanter Embryonen der 4 phänotypischen Gruppen sind aufgrund ihrer starken Defekte sehr gut zu erkennen. Im Gegensatz hierzu ist der Tracheenphänotyp mutanter Embryonen zweier weiterer P-Linien nur sehr schwer zu identifizieren und kann in keine der 4 Gruppen eingeordnet werden. Es werden alle Tracheenäste ausgebildet und sowohl Fusion als auch gerichtetes Auswachsen der Äste sind normal. Erst eine genauere Analyse zeigte, dass die im WT normalerweise gerade ausgewachsenen Tracheenästen (Abb.2.1,A) in den Mutanten stark wellenförmig erscheinen (Abb.2.1,B). Der beobachtete Phänotyp war zu diesem Zeitpunkt noch unbekannt. Zu erklären ist ein solcher Phänotyp möglicherweise durch ein verlängertes Auswachsen der Tracheenäste. Da die Gesamtgröße des Tracheensystems innerhalb des Embryos begrenzt ist (Kühnlein et al., 1996), weicht möglicherweise das zusätzlich gebildete Astmaterial in die unmittelbare Umgebung aus, und die Äste erscheinen wellenförmig. Aufgrund des gezielten Durchmusterens mutanter Embryonen der P-Insertionskollektion nach wellenförmigen Tracheenästen sind insgesamt sieben rezessive P-Mutantenlinien identifiziert worden.

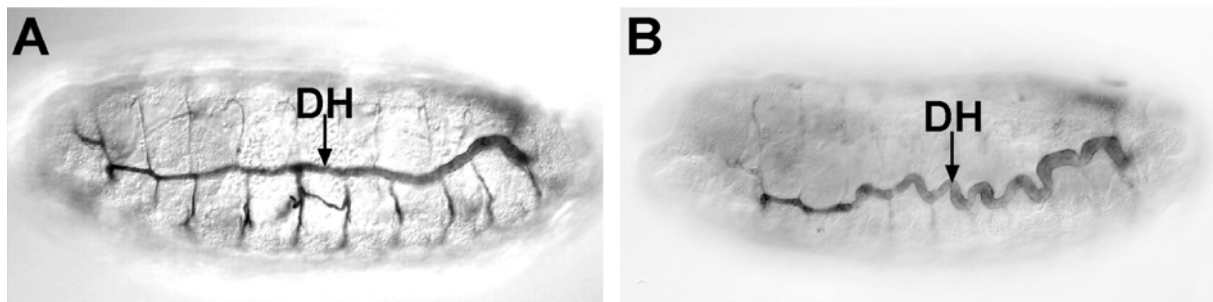


Abb.2.1: Das Tracheensystem im WT Embryo und im Embryo mit mutanter Tracheenmorphogenese. 2A12 Antikörperfärbung an st16 WT (A) und l(1)G0012-P-mutanten (B) Embryototalpräparaten in ventraler Ansicht. 2A12 ist gegen ein unbekanntes Tracheenlumenantigen gerichtet, mit dessen Hilfe alle Tracheenlumina im Embryo sichtbar gemacht werden können. **(A):** der dorsale Hauptstamm (DH, Pfeil) ist im WT Embryo gerade von posterior nach anterior ausgewachsen. **(B):** In Embryonen, mit mutanter Tracheenmorphogenese erscheint der DH (Pfeil) wellenförmig. Die Embryonen sind anterior nach links und dorsal nach oben angeordnet, was auch in den folgenden Abbildungen beibehalten wird. Abweichende Darstellungen werden gesondert erwähnt. dorsaler Hauptstamm (DH).

2.1.2 Identifizierung von Genen, die tracheale Morphogenese kontrollieren

Von den 7 identifizierten P-Insertions-Linien wurden mit Hilfe des „Plasmidrettungs- („plasmid-rescue“-) Verfahrens (siehe 4.5.15) die genomischen Insertionsstellen bestimmt. Die P-Linien l(1)G0276 (G0276, die Linien werden im weiteren Text nur mit G für Göttingen und der entsprechenden Nummer abgekürzt), G0342 und G0456 integrieren in das Tumorsuppressor Gen *discs large* (*dlg*), ein Membran assoziiertes Guanylat Kinase Homolog

(MAGUK). DLG ist für die Bildung der Septate Junctions in Tracheenzellen und anderen epithelialen Zellen notwendig. Ein Fehlen der *dlg* Funktion führt zum Verlust der Organisation epithelialer Zellen sowie zur Veränderung der zellulären Membranstruktur und dem assoziierten Zytoskelett (Woods und Bryant, 1991; Woods et al., 1996).

Die P-Elemente der übrigen vier P-Insertions-Linien sind in zwei noch unbekannte Gene integriert. Die Insertionen der beiden P-Linien G0162 und G0328 liegen im Chromosomenabschnitt 15C4 (Peter et al., 2002; Berkeley *Drosophila* Genome Project, BDGP) in der Transkriptionseinheit des putativen Gens CG9089 (BDGP), das aufgrund des trachealen P-Insertionsphänotyps als *wurst* bezeichnet wurde (siehe 2.7.ff.). Die Linien G0012 und G0044 sind im Chromosomenabschnitt 2A4 (Peter et al. 2002, BDGP) in der Transkriptionseinheit des vorhergesagten Gens CG14779 (BDGP) inseriert. CG14779 konnte als das *megatrachea* Gen identifiziert werden (siehe 2.2.ff.)

2.2 Molekulare Analyse von *megatrachea* (*mega*)

2.2.1 Die P-Linien G0012 und G0044 sind Allele von *mega*

Der wellenförmige tracheale Phänotyp von mutanten Embryonen der Linien G0012 (Abb.2.1,B) und G0044 ist dem Tracheenphänotyp mutanter Embryonen der Linien *mega*^{VE896} und *mega*^{EA97} (Beitel und Krasnow, 2000; Synonym *pickle*, Perrimon et al., 1989) sehr ähnlich (Abb.2.15). Sowohl bei *mega*^{VE896} als auch bei *mega*^{EA97} ist das *mega* Gen durch eine chemisch induzierte Ethylmethansulfonat (EMS) Mutagenese betroffen. Eine molekulare Analyse der beiden EMS-Mutantenlinien und des betroffenen *mega* Gens fand bisher noch nicht statt. Es ist jedoch bekannt, dass die Mutationen und damit das betroffene *mega* Gen auf dem X-Chromosom innerhalb der Region 1E3 bis 2B2 liegen. Die P-Elemente der Linien G0012 und G0044 sind ebenfalls innerhalb dieser Region in 2A4 inseriert (Peter et al., 2002; persönliche Mitteilung U. Schäfer).

Ein Allelitätstest zeigte, dass die Linien G0012 und G0044 eine Komplementationsgruppe zusammen mit *mega*^{VE896} und *mega*^{EA97} bilden (siehe 4.6.6). Die beiden P-Linien stellen daher neue *mega* Allele dar und werden im weiteren Text als *mega*^{G0012} und *mega*^{G0044} bezeichnet.

2.2.2 Identifizierung des Gens *mega*

Mit den P-Linien *mega*^{G0012} und *mega*^{G0044} war es möglich, einen schnellen und einfachen molekularen Zugang zur *mega* Transkriptionseinheit herzustellen. Beide P-Elemente sind in das zweite Exon unmittelbar vor dem offenen Leserahmen (OLR) von Gen CG14779

Exon4=196bp und Exon5=676bp; IntronI=71bp, IntronII=77bp, IntronIII=59bp, IntronIV=53bp). Kurz vor dem Transkriptionsstart befindet sich eine TATA-Box Konsensussequenz und direkt vor dem Start eine Initiatorsequenz (Inr; Abb.2.2,B). Innerhalb des Transkriptionsbereichs ist nach 38bp ein Downstream-Promotor-Element (DPE) vorhanden. Dies deutet darauf hin, dass es sich um den tatsächlichen Start des Transkripts handelt. In dem Transkript befindet sich ein OLR, der sich mit seinen 768bp in Exon 2 beginnend bis Exon 5 erstreckt (Abb.2.2,B,blau). Der OLR kodiert ein 256 Aminosäuren großes putatives Protein (FBgn0025384) mit einer vorhergesagten Größe von 29kDa.

Zur eindeutigen Identifizierung des *mega* Gens wurde die genomische DNA von *mega*^{VE896} und *mega*^{EA97} mutanten Embryonen auf Mutationen hin untersucht (siehe 4.5.16). Eine Sequenzanalyse deckt hierbei Punktmutationen im OLR des Gens CG14779 der *mega* Embryomutanten auf (Abb.2.2,A,B). Bei *mega*^{EA97} bewirkte ein Nukleotidaustausch einen As-Austausch von Glutaminsäure (E) zu Valin (V) im Protein an der Position 97, während bei *mega*^{VE896} ein Nukleotidaustausch zum As-Austausch von Valin (V) zu Methionin (M) an der Position 113 führte (Abb.2.2,B).

2.2.3 MEGA ist ein Transmembranprotein mit einem PDZ-Binde-Motiv

Mit Hilfe von Analyseprogrammen wurden verschiedene strukturelle Komponenten im MEGA Protein erkannt. So deuten drei unterschiedlich arbeitende Computeranalysen gemeinsam auf 4 Transmembrandomänen (TM-Domänen) hin. Mit Hilfe eines Hydrophobizitäts-Blots wurden 4 stark hydrophobe (Abb.2.3,A, blaue Linie) Regionen ermittelt. Diese hydrophoben Regionen wurden auch durch die TM-Analyseprogramme DAS (Abb.2.3,B) und TMHMM 2.0 (Abb.2.3,C; Möller et al., 2001) als TM-Domänen erkannt. Die erste TM-Domäne erstreckt sich von As 29 bis 49, die zweite Domäne von As 110-130, die dritte von As 153-173 und die vierte Domäne von 191-211. Mit Hilfe von TMHMM wurde außerdem ermittelt, dass sowohl der N-Terminus (As 1-28) als auch der C-Terminus (As 212-256) im Zytoplasma liegen. Als putatives TM-Protein gehört MEGA zur Klasse der sekretorischen Proteine, die durch sekretorische Signal-Peptide gekennzeichnet sind. Ein Computeranalysemodell für Signal-Peptide (cbs) ermittelt bei jeder einzelnen As die Wahrscheinlichkeit, ob sie zu einem Signal-Peptid gehört oder nicht. Bei MEGA ist die Sequenz von der 34.As bis zur 49.As mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit ein Signal-Peptid (Abb.2.3,D). Bei diesem Programm bleibt jedoch ungeklärt, ob eine Prozessierung des Signal-Peptids erfolgt (Nielsen et al., 1997). Ein Antikörper, der gezielt gegen die ersten 15 Aminosäuren vom MEGA N-Terminus gerichtet ist, erkennt das MEGA Protein im Embryo (siehe 2.2.6). Daher besitzt MEGA kein Signal-Peptid, sondern einen sogenannten „Signal-Anker“, der nicht von der restlichen Polypeptidkette abgetrennt wird. Aufgrund des intrazellulären N-Terminus, ist MEGA dem

Typ II Membranprotein zuzuordnen (Spiess, 1995). Um zu überprüfen, ob MEGA möglicherweise modifiziert wird, wurden mit NetPhos (siehe 4.5.19) sechs putative Regionen mit Phosphorylations-Konsensussequenzen (Position 9, 12, 15, 26, 239, 247; Abb.2.4 in schwarz; Blom et al., 1999) gefunden. Weitere Modifikationen, wie z.B. Glykolysierungen, wurden nicht detektiert.

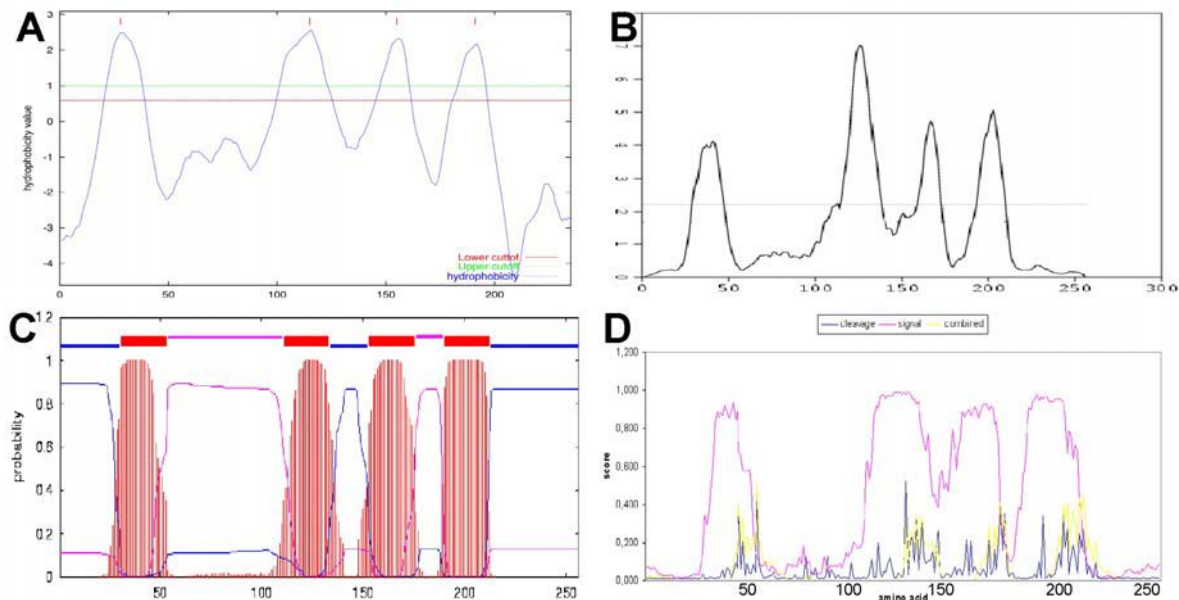


Abb.2.3: Strukturanalyse des putativen MEGA Proteins. Mit Hilfe verschiedener Analyseprogramme können 4 Transmembran-(TM-)Domänen ermittelt werden. (A-C): Die 4 stark ansteigenden Werte (blaue Linie) des Hydropobizitäts-Blots (A) entsprechen auch den TM-Domänen, die durch die TM-Analyseprogramme DAS (B) und TMHMM (C, rot schraffierter Bereich, roter Balken) ermittelt wurden. Außerdem berechnet TMHMM, dass sowohl N-Terminus als auch C-Terminus im Zytoplasma liegen (C, blaue Balken bzw. Linie). Die Bereiche zwischen der ersten und zweiten bzw. der dritten und vierten TM-Domäne liegen außerhalb der Zelle (C, violette Balken und Linie). (D): MEGA besitzt einen Signal-Anker, der sich von As 34-49 erstreckt (D, violette Linie).

Aufgrund der Sequenzeigenschaften der letzten 4 C-terminalen Aminosäuren von MEGA wurde ein putatives PDZ-Binde-Motiv gefunden. Es gibt drei Klassen der PDZ-Binde-Motive, die sich in der Proteinsequenz am C-terminalen Ende unterscheiden (Sheng und Sala, 2001; Songyang et al., 1997). MEGA besitzt an der drittletzten und letzten Proteinsequenzposition mit Glycin und Isoleucin jeweils eine hydrophobe Aminosäure (Abb.2.4,A), was charakteristisch für ein Klasse 2 PDZ-Binde-Motiv ist.

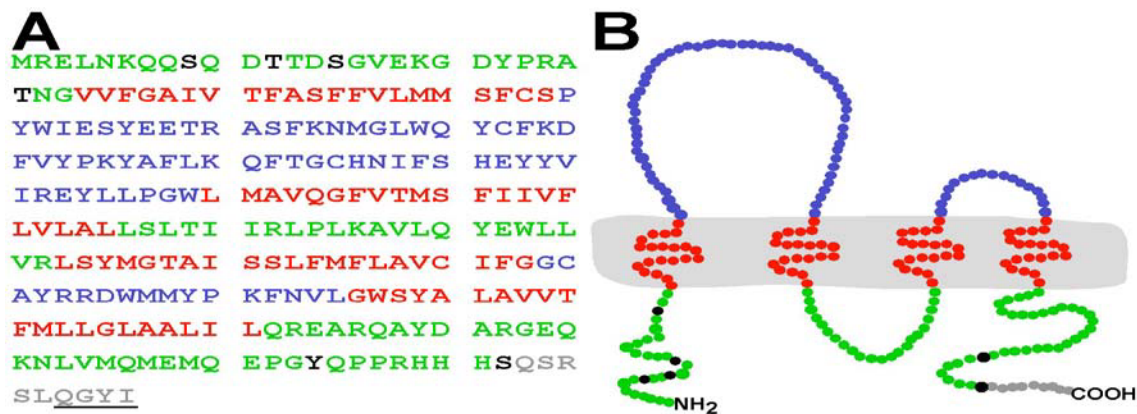


Abb.2.4: Die MEGA Proteinsequenz und Struktur. (A): Die MEGA Proteinsequenz lässt sich in verschiedene Bereiche aufteilen, wobei die **intrazellulären-Domänen grün**, die **extrazellulären-Domänen blau**, die **TM-Domänen rot** und die hochkonservierte C-terminale Region in **grau** gekennzeichnet sind. Putativ phosphorylierte Aminosäuren sind in **schwarz** gedruckt und der Bereich des PDZ-Binde-Motivs ist **unterstrichen**. **(B):** MEGA Strukturmodell, das aufgrund der identifizierten Domänen zusammengesetzt wurde und mit der **Membran (hellgrau)** assoziiert ist. Jeder einzelne Punkt entspricht einer As. Die Farbverteilung für die einzelnen Domänen ist wie in A.

2.2.4 MEGA ist ein Claudin ähnliches Protein

Homologievergleiche von MEGA mit allen potentiellen Proteinen (BDGB, NCBI, SwissProt) zeigen eine hohe Ähnlichkeit von MEGA zur Super-Familie der Claudine. Die Claudine stellen einen Hauptbestandteil der „Tight Junctions“ von Vertebraten dar (Furuse et al., 1998b; Gow et al., 1999; Morita et al., 1999b). Von den mittlerweile jeweils mehr als 20 bekannten Claudinen in Maus und Mensch (Furuse et al., 1998a; Morita et al., 1999a; Tsukita und Furuse, 2002), wurden die 16 frei verfügbaren Proteinsequenzen (NCBI) aus Maus mit der MEGA Sequenz verglichen. Die höchsten Ähnlichkeiten mit der MEGA Proteinsequenz besitzen Claudin-10 (Kiuchi-Saishin et al., 2002; AF124425) mit 19% Identität bzw. 41% Ähnlichkeit und Claudin-18 (Niimi et al., 2002; NM_019815) mit 20% Identität bzw. 37% Ähnlichkeit. Zudem sind Claudin-10 mit 231 Aminosäuren und Claudin-18 mit 264 Aminosäuren im Gegensatz zu den meisten anderen Claudinen ähnlich groß wie MEGA (256 Aminosäuren). Die Proteinstruktur der Claudine ist nahezu identisch mit der von MEGA (vgl. mit Abb.2.4,B). Claudine besitzen vier TM-Domänen und sowohl das N-terminale Ende, als auch das C-terminale Ende reichen in das Zellzytoplasma. Genau wie MEGA haben die Claudine zwischen der ersten und zweiten TM-Domäne eine große und zwischen der dritten und vierten TM-Domäne eine kleine extrazelluläre Schleife (Tsukita und Furuse, 1999; Tsukita und Furuse, 2002). Ein weiteres typisches Charakteristikum (mit Ausnahme der Claudine 11-13) ist ein PDZ-Binde-Motiv am C-terminalen Ende der Claudine (Itoh et al., 1999; Hamazaki et al., 2002; Heiskala et al., 2001; Poliak et al., 2002; Roh et al., 2002). Ein Proteinsequenzvergleich zeigt, dass die TM-Domänen, die große extrazelluläre Schleife und

das C-terminale Ende mit dem PDZ-Binde-Motiv von MEGA die höchsten Ähnlichkeiten mit den entsprechenden Domänen von Claudin-10 und 18 besitzen (Abb.2.5).

A

```

MEGA:      MRELNKQQSQDTTDSGVEKGDYPRATNG--VV-FGAIVTFASFFVLMMS-FCSPYW-IESYEE
              | : : | : | : : : : | : | : : | : | :
Cld-10:      -----MASTALEIVAF--VVSISG-WVLVSSTL-PDYWKV-STID
MEGA:      ----TRAS-FKNMGLWQYCFKD-FVYPKYAFLKQFTGCHNIFSHEYYVIREYLLPGWLMAVQG
              | | : | | | : | | | | : | : : : | | | | :
Cld-10:      GTVITTATYFAN-LWKICVTDSTGV----ANCKEFPs--MLALDGY----ACRGLMIA--A
MEGA:      FVTMSFI-IVFLVLALLSLTIIRLPLKAVLQYEWLLVRLSYMGTAI-SSLF-MFL-AVCIFG-
              | : : | : | : : : : : : | : : | : | : : : :
Cld-10:      -VSLGFFGSIF---ALFGMKCTKVG-SD-QAKAKIACLAGIVF-ILSGLCSMTGCSL--YAN
MEGA:      -GCA-YRRDWMYP--KFNV---L--GWSYA-LAVVTFMLLGLAALIL-QREA-RQAYDARGE
              : : | : | : : | : | : | : : : : : : : : | : :
Cld-10:      KITTEFF-DP-LYMEQKYELGAALFIGWAGASLCIIGGVIFCFS-ISDNK-TPRMGY-TY--
MEGA:      QKNL---VMQMEMQEPGYQPPRHHH-----S-QS-RSLQGYI
              |   ||       ||       | | : : | :
Cld-10:      --NGPTSMSSRTK---YQGEGDFKTAGPSKQFDK--NAYV
  
```

B

```

MEGA:      MRELNKQQSQDTTDSGVEKGDYPRAT--NGVVFAGIVTFASFFV--LMSFCS-PYW--IESYE
              ||   || | : : : : : : : : : | : | :
Cld-18:      -----MATTCQVV-GLLLSLGL-AGCIAAT--GMDMWSTQDLYD
MEGA:      E--TRASFKNMGLWQYCFKDFVYPKYAFLKQFTGCHNIFSHEYYVIREYLLPGW-----LMAV
              | | : | | | : | : | : | : | : | : | : |
Cld-18:      NPVT-AVFQYEGLRSCVQQ-----SS--GFTECR--P--YFTILG--LPAMLQAVRALMIV
MEGA:      QGFVTMSFII-VFLV-L-ALLSLTI-IR-LPLKAV--LQYEWLLVRLSYMGTAISSLFMFLAVC
              | | : : | : | : | : | : | : | : | : | : | : |
Cld-18:      -GIV-LG-VIGI-LVSIFAL--KCIRIGSMDDSAKAKM--TLTSGI--LFI-ISGICAIIGVS
MEGA:      IFGGCAYRRDWM----MYPKFNVL-----GWSYAL--AVVTFML-LGLAA-LI-L-
              : | : | : | : | : : : : | : | : | : | : : : :
Cld-18:      VFANMLVTNFWMSTANMYSGMGMGMVQTVQTRYTFG-A-ALFVGWVAGGLTL-IGGVMMCTIA
MEGA:      QRE-----AR--QA--YDARGEQKNLVMQMEMQEPG-YQPPRHHHS-----
              | : : : | | | | : | : | : | : | : | : |
Cld-18:      CRGLTPDDSNFKAVSYHASG-Q-N-VAYR---PGGFKASTGFGSNTRNKKIYDGGARTEDDE
MEGA:      QSR-SLQGYI
              | : : : | :
Cld-18:      QSHPTKYDYV
  
```

C



Abb.2.5: Proteinsequenzvergleich von MEGA mit Claudin-10 und -18. Aminosäuren der intrazellulären Domänen sind grün, der extrazellulären Domänen blau, der TM-Domänen rot und der C-terminalen PDZ Region grau markiert. Identische Aminosäuren sind mit „|“ und ähnliche mit „:“ gekennzeichnet. **(A)** Sequenzvergleich zwischen MEGA und Claudin-10. Die Proteine besitzen 19% Identität (56/294 Aminosäuren) und 41% Ähnlichkeit (120/294 Aminosäuren). **(B)** MEGA und das Claudin-18 Protein besitzen 20% Identität (64/324 Aminosäuren) und 37% Ähnlichkeit (119/324 Aminosäuren). **(C)** Sequenzvergleiche einzelner Domänen von MEGA mit Claudin-10 und -18 zeigen, dass die höchsten Identitäten und Ähnlichkeiten in den TM-Domänen, der großen extrazellulären Domäne und der C-terminalen PDZ-Region vorhanden sind. Die Sequenzvergleiche wurden anhand der PAM (Point accepted mutation) 250 Matrix (Altschul, 1991) vorgenommen.

2.2.5 Expressionsstudie des *mega* Transkripts

CG14779 wurde als das *mega* Gen identifiziert (siehe 2.2.2). Um in Embryonen das *mega*-RNA-Transkript analysieren zu können, wurden mit Hilfe von *mega* cDNAs (LD32916, LD14222 und CK0029) Digoxigenin-markierte-antisense-RNA-Sonden hergestellt (siehe 4.5.11).

Das beobachtete Fluoreszenz-mRNA-Expressionsmuster der drei RNA-Sonden ist identisch. Weil außerdem in *mega*^{G0012} und *mega*^{G0044} mutanten Embryonen zygotisch gebildetes *mega*-Transkript nicht detektierbar ist (siehe 2.3.1), erkennen die RNA-Sonden spezifisch das *mega*-Transkript.

Das *mega*-Transkript ist als maternale Komponente bis in das Blastodermstadium gleichmäßig im Embryo verteilt (Abb.2.6,A; st5). Erste zygotisch gebildete mRNA kann mit Beginn der Keimstreifenverkürzung (st 11; Abb.2.6,B,C, vgl. st10 mit st11) detektiert werden. Das *mega*-Transkript wird während der embryonalen Entwicklung ausschließlich in ektodermalen Epithelien (Abb.2.6,C-H, st11-st16) exprimiert. In der Epidermis, den Speicheldrüsen (Abb.2.6,I), dem Vorder- und Hinterdarm (Abb.2.6,J,K) ist *mega* in gleichbleibender Expressionsstärke bis zum Ende st16 detektierbar. Im st16 vermindert sich jedoch insbesondere im Tracheensystem (Abb.2.6, vgl. M mit N) die *mega* Expressionsstärke. Die *mega* Expression in Gliazellen der ventralen Mittellinie (Abb.2.6,L) ist erst relativ spät in der embryonalen Entwicklung ab st. 14 zu erkennen.

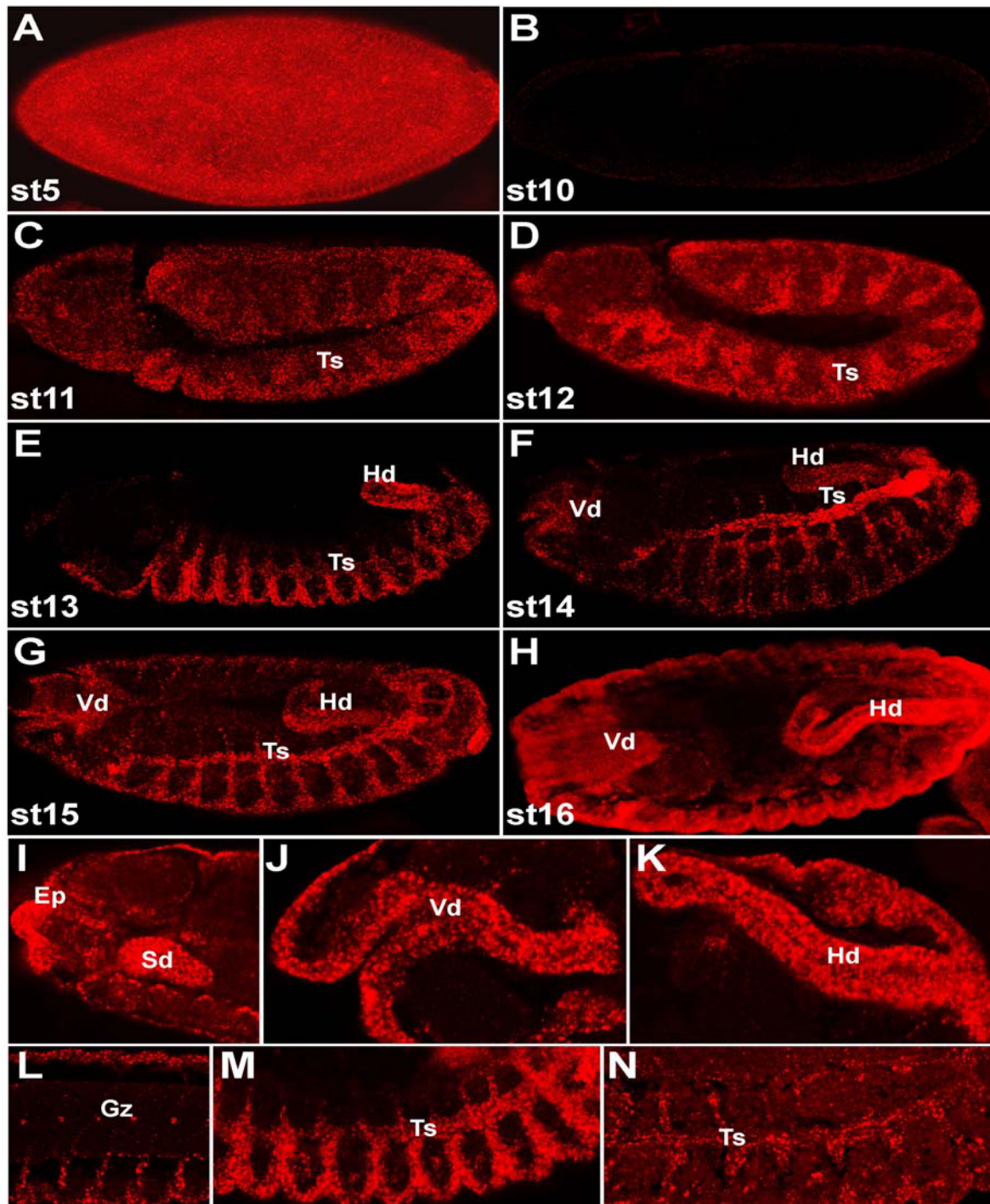


Abb.2.6: Embryonales *mega* mRNA-Expressionsmuster. Gezeigt sind *mega* antisense-RNA Fluoreszenz *in situ* Studien an WT Embryonen in ventraler Ansicht (Embryo in H in dorsaler Ansicht, in L in ventraler Ansicht). **(A):** Maternal deponierte *mega* mRNA ist bis in das Blastodermstadium (st5) zu detektieren. **(B):** Nach dem Abbau der maternalen Komponente ist die *mega* mRNA bis einschließlich st10 nicht mehr detektierbar. **(C-H):** Erste zygotische Expression beginnt ab Stadium 11 (C) und besitzt seine höchste Expressionsstärke während st12 (D), st13 (E), st14 (F), st15(G) und st16 (H). **(I-N):** Vergrößerung aus einem Stadium 14 Embryo zeigen, dass *mega* ausschließlich in ektodermalen, epithelialen Geweben transkribiert wird: in der Epidermis (I), den Speicheldrüsen (I), Vorder- (J) und Hinterdarm (K), in Gliazellen der ventralen Mittellinie (L) und dem Tracheensystem (M). Die Expression in den Gliazellen (L) beginnt erst ab st14, und die Tracheenexpression schwächt sich im st16 ab (N). Epidermis (Ep), Gliazellen (Gz), Hinterdarm (Hd), Speicheldrüsen (Sd), Tracheensystem (Ts), Vorderdarm (Vd).

2.2.6 Das MEGA Protein ist in ektodermalen epithelialen Geweben exprimiert

Um die Expression und die zelluläre Lokalisation des MEGA Proteins im Embryo analysieren zu können, wurden zwei affinitätschromatographisch aufgereinigte polyklonale Antikörper hergestellt, die spezifisch unterschiedliche MEGA-Domänen erkennen. Da beide Proteintermini im Zytoplasma liegen (siehe 2.2.3) und deshalb durch Färbemethoden nachweisbar sein sollten, sind die Antikörper gegen Proteinteilsequenzen vom N- bzw. C-Terminus des MEGA Proteins gerichtet (siehe 4.5.20). Das Fehlen einer Antikörperreaktion in homozygoten *mega* P-mutanten Embryonen (siehe 2.3.1) zeigt, dass beide Antikörper MEGA spezifisch erkennen.

Wie bei der mRNA, so ist auch maternales MEGA Protein bis in das zelluläre Blastodermstadium (st5) nachweisbar (Abb.2.7,A). Nach dem Abbau der maternalen Komponente ist MEGA bis einschließlich st11 nicht mehr detektierbar (Abb.2.7,B). Die erste zygotische MEGA Expression beginnt mit st12 (Abb.2.7,C) und ist bis zum Ende der Embryogenese in ektodermalen Epithelien nachweisbar (Abb.2.7,C-H).

Das MEGA Protein wird wie die mRNA in der Epidermis, im Tracheensystem (Abb.2.8,A), im Vorder- und Hinterdarm (Abb.2.8,B) und den Speicheldrüsen (Abb.2.8,C) exprimiert. Ein sehr ähnliches Expressionsmuster wurde auch für das TM-Protein NRX (siehe 1.3.1) beschrieben. NRX wird ab st 12 ebenfalls in der Epidermis, dem Tracheensystem, dem Vorder- und Hinterdarm und den Speicheldrüsen aktiviert (Baumgartner et al. 1996, siehe 1.3.1). Des weiteren werden MEGA und NRX auch in den Scolopidia der lateralen Chordotonalorganen (Abb.2.8,D,E) und in Zellen des peripheren Nervensystems (PNS, Abb.2.8,G,H) koexprimiert (Abb.2.8,F,I). Der einzige Expressionsunterschied ist in Gliazellen der ventralen Mittellinie zu beobachten (Abb.2.8,L), wo MEGA (Abb.2.8,J) nur in einigen der NRX exprimierenden Zellen detektierbar ist (Abb.2.8,K).

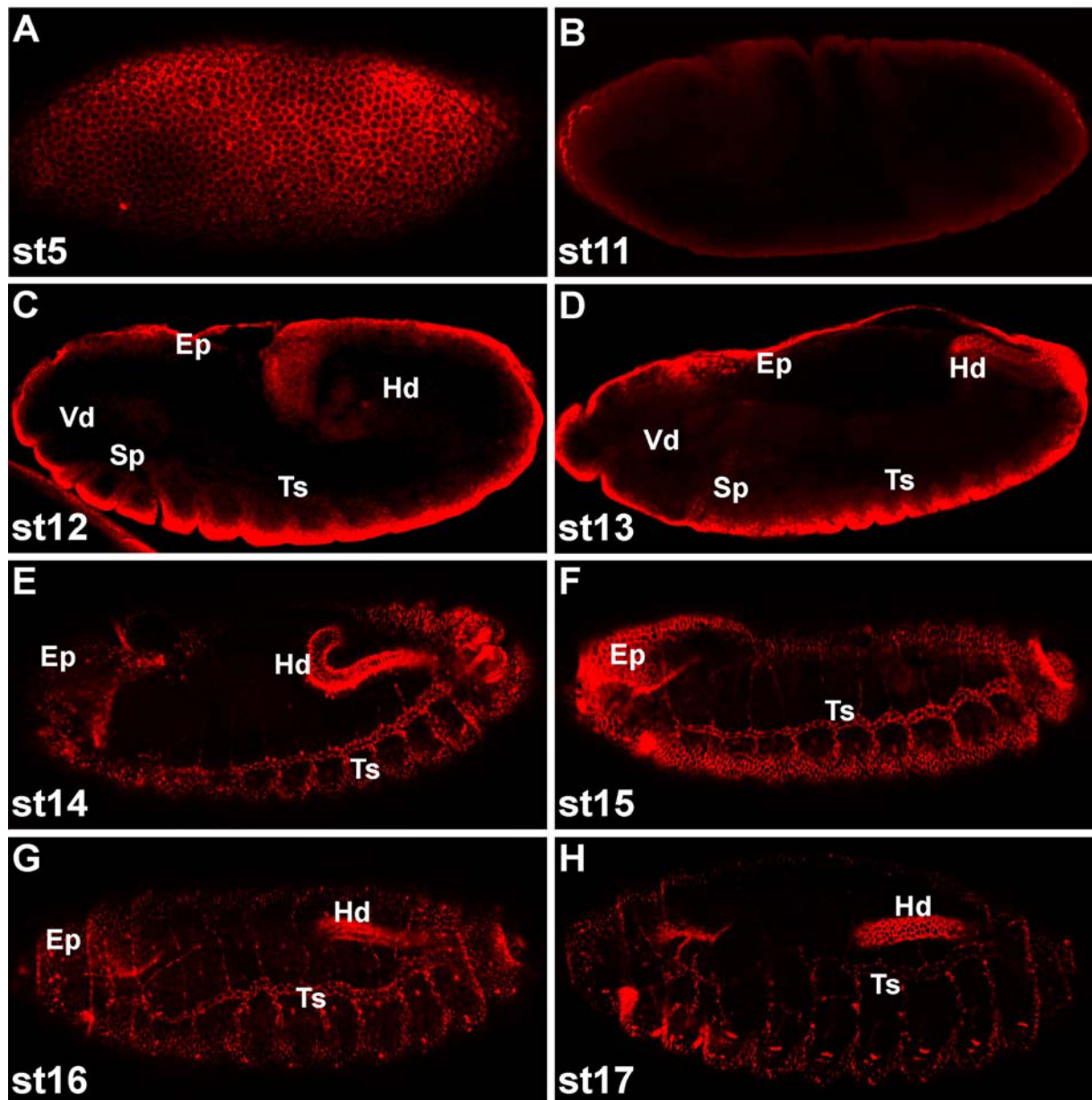


Abb.2.7: Expressionsmuster des MEGA Proteins im WT Embryo. Fluoreszenzantikörperfärbungen an WT Embryonen (laterale Ansicht) mit dem affinitätschromatographisch aufgereinigten polyklonalen Antikörper aus Kaninchenserum, der gegen das C-terminale Ende von MEGA gerichtet ist. **(A):** Die maternale MEGA Komponente ist im Embryo bis in das zelluläre Blastodermstadium verteilt (st5). **(B):** Nach dem Abbau des maternalen MEGA Proteins ist MEGA bis st11 nicht mehr detektierbar. **(C-H):** Die zygotische MEGA Expression ist ab st 12 (C) und in gleichbleibender Stärke während st13 (D), st14 (E), st15 (F), st16 (G) bis zum Ende der Embryogenese (st17, H) ausschließlich in ektodermalen Epithelien detektierbar. Epidermis (Ep), Hinterdarm (Hd), Speicheldrüsen (Sp), Tracheensystem (Ts), Vorderdarm (Vd).

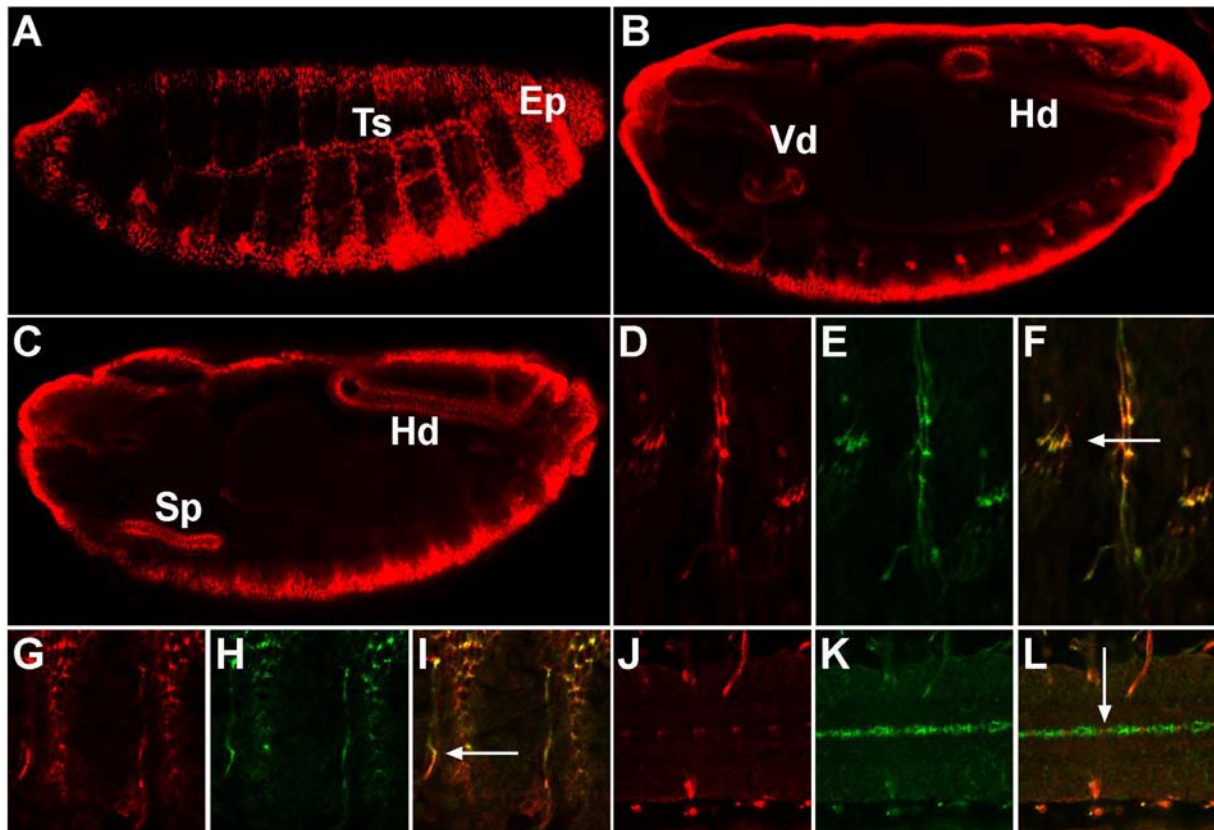


Abb.2.8: MEGA besitzt ein NRX ähnliches Expressionsmuster. (A-L): Fluoreszenzantikörperfärbungen an st15 WT Embryonen (laterale Ansicht A-C; Teilausschnitte D-L) mit affinitätschromatographisch aufgereinigten polyklonalen Antikörper der gegen den **MEGA** (rot) N-Terminus gerichtet ist und aus Meerschweinchen Serum gewonnen wurde und mit anti-NRX (grün) Antikörper. **(A-C)**: MEGA ist in der Epidermis (A) und dem Tracheensystem (A), dem Vorderdarm (B), dem Hinterdarm (C) und den Speicheldrüsen (C) lokalisiert. In denselben Geweben ist auch NRX exprimiert (Baumgartner et al. 1996). **(D-L)**: Ausschnittsvergrößerungen zeigen, dass MEGA des Weiteren in den lateralen Chordotonalorganen (D) und in Zellen des peripheren Nervensystems (G) mit NRX (E,H) koexprimiert (F,I, Pfeile) ist. Lediglich in Zellen des zentralen Nervensystems gibt es Unterschiede im Expressionsmuster von MEGA und NRX. MEGA (J) ist nur in einem Teil der NRX (K) exprimierenden Gliazellen der ventralen Mittellinie detektierbar (L, Pfeil). Epidermis (Ep), Hinterdarm (Hd), Speicheldrüsen (Sp), Tracheensystem (Ts), Vorderdarm (Vd).

2.2.7 MEGA ist eine Septate Junction Komponente

Aufgrund der vorhergesagten TM-Domänen im MEGA Strukturmodell (siehe 2.2.3) war zu erwarten, dass MEGA membranständig ist. Eine Kolokalisationsstudie von MEGA mit einem Membranmarker bestätigt dies. Mit Hilfe des anti- α -SPECTRIN Antikörpers (Dubreuil et al., 1997) kann durch konventionelle Fluoreszenzfärbemethoden die Zellmembran sichtbar gemacht werden. Der Antikörper erkennt die α -Untereinheit des Membranskelettproteins SPECTRIN (besteht aus α - und β -Untereinheiten), das an integrale Membranproteine geknüpft ist (Thomas, 2001). Konfokale Aufnahmen an den Tracheenzellen (Abb.2.9,A), den

Speicheldrüsenzellen (Abb.2.9,B), der Epidermis (Abb.2.9,C) und dem Hinterdarm (Abb.2.9,D) zeigen Kolokalisation von MEGA mit SPECTRIN an der Zellmembran.

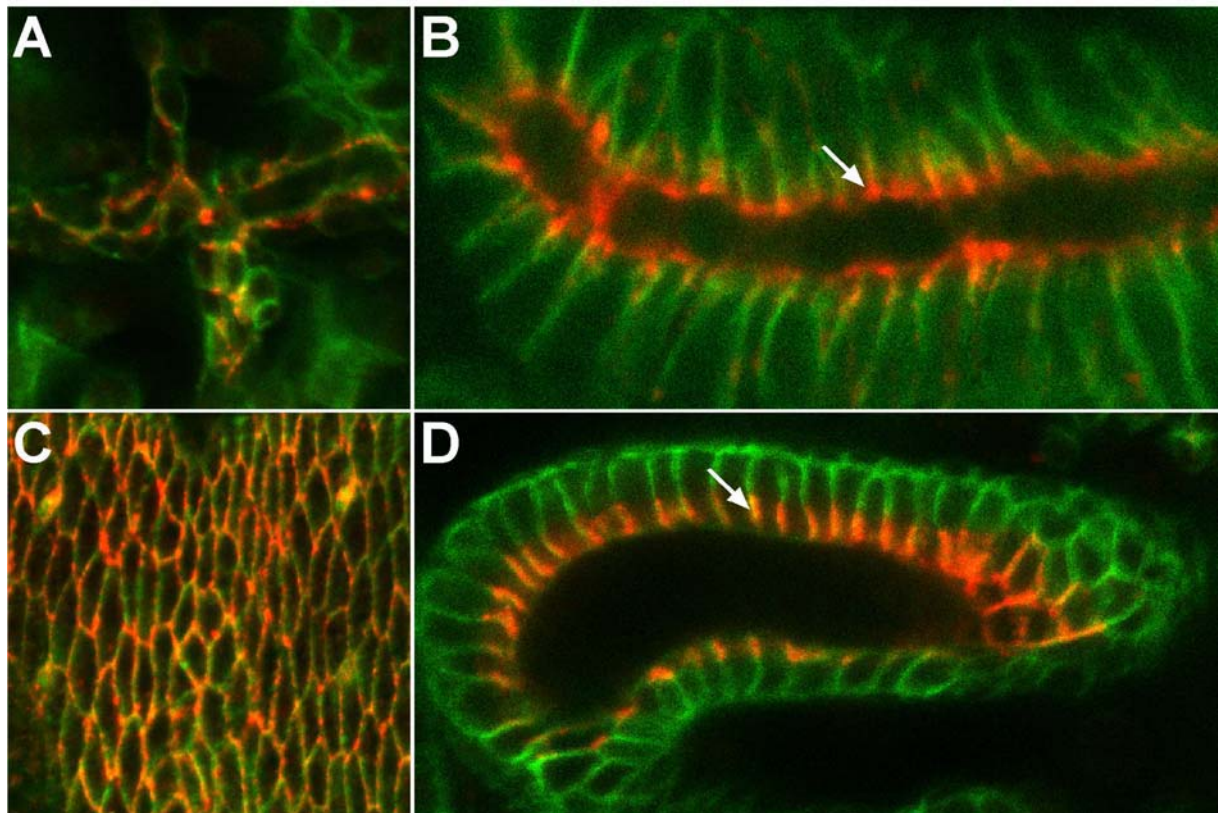


Abb.2.9: MEGA ist an der Membran mit α -SPECTRIN kolokalisiert. Gezeigt sind anti- α -SPECTRIN (grün) und anti-MEGA (rot) Fluoreszenzantikörperdoppelfärbungen an WT Embryonen im st15. **(A-D):** Teilausschnitte zeigen die Kolokalisation von MEGA mit dem Membranmarker α -SPECTRIN an einem einzelnen trachealen Metamer (A), einer Speicheldrüse (B), in epidermalen Zellen (C) und dem Hinterdarm (D). **(B, D):** Besonders gut ist in den Speicheldrüsen (C) und am Hinterdarm (D) zu beobachten, dass die MEGA Lokalisation auf einen apikalen Teilbereich der lateralen Zellmembran begrenzt ist (Pfeile).

Aufgrund der Aufnahmen an der Speicheldrüse (Abb.2.9,B) und dem Hinterdarm (Abb.2.9,D) wird außerdem deutlich, dass sich die Lokalisation von MEGA nicht über die gesamte Zellmembran erstreckt, sondern an der lateralen Zellmembran auf einen kleinen apikalen Bereich begrenzt ist.

Die Zellen der ektodermalen Epithelien sind polarisiert und besitzen eine apikale und eine basale Seite. Der Prozess der Polarisierung ektodermaler Gewebe startet schon während der Zellularisierung im Blastodermembryo. Die laterale Zellmembran wird de Novo von der apikalen zur basalen Seite ausgebildet. Hierbei entstehen entlang der lateralen Membran verschiedene Regionen mit unterschiedlichen spezifischen Funktionen (siehe 1.2; Lecuit und Wieschaus, 2002; Tepass et al. 2001). Diese einzelnen Regionen lassen sich gezielt mit spezifischen Markern visualisieren (siehe Tabelle.1.1). Um die exakte MEGA Lokalisation an

der lateralen Zellmembran zu ermitteln, wurden Koloalisationsstudien von MEGA und Markern der lateralen Zellmembran durchgeführt. Die Analyse fand anhand konfokaler Aufnahmen von Hinterdarmzellen mit einer voll ausgebildeten lateralen Zellmembran im st16 statt.

Die **Marginale Zone** (MZ; Tepass, 1996; siehe 1.2), auch Subapikale Region (SAR; Knust und Bossinger, 2002; Müller 2003) genannt, ist die am weitesten apikal gelegene Region entlang der lateralen Zellmembran. CRB ist ausschließlich in der MZ lokalisiert und maßgeblich an der Polarisierung epithelialer Zellen beteiligt (siehe 1.2.1; Müller und Wieschaus, 1996; Tepass et al., 2001). Eine Antikörperdoppelfärbung mit anti-CRB (Tepass et al., 1990) und anti-MEGA zeigt, dass beide Proteine nicht koloalisiert sind (Abb.2.10,A-C). Die MZ wird basal von der **Zonula Adherens** (ZA; siehe 1.2) begrenzt. Die ZA ist durch Zelladhäsion und Verknüpfung der Zellmembran zum Zytoskelett entscheidend an dem Aufbau und dem Erhalt der Zellarchitektur beteiligt. Das Protein ARM (das *Drosophila* Homologe von β -CATENIN) ist in seiner subzellulären Lokalisation auf die ZA begrenzt und an deren Zellfunktionen beteiligt (Cox et al., 1996; Tepass et al., 2001). Eine Doppelfärbung von anti-ARM (Riggelman et al., 1990) und anti-MEGA Antikörpern zeigt keine Koloalisation der beiden Proteine (Abb.2.10,D-F). Die „**Septate Junctions**“ (SJ) bilden an der lateralen Zellmembran die basale Nachbarregion zur ZA. In *Drosophila* gibt es glatte (smooth) und gefaltete (pleated) SJs, die sich in Ihrer Form und Lokalisation unterscheiden (siehe 1.2; Tepass und Hartenstein, 1994). Die beiden bisher identifizierten TM-Proteine der SJs sind FAS3 (siehe 1.3.1; Patel et al., 1987; Abb.2.20,C), das in beiden Formen der SJs vorkommt und NRX, das spezifisch in den pSJs lokalisiert ist. NRX bindet das ebenfalls ausschließlich in den pSJ lokalisierte COR (siehe 1.3.1; FERM-domänen Protein, *Drosophila* Homolog des Membranskelett Proteins 4.1; Fehon et al., 1994). Sowohl NRX (Abb.2.10,H) als auch COR (Abb.2.10,K) sind mit MEGA koloalisiert (Abb.2.10,I,L). MEGA ist daher offensichtlich ein spezifisch in den pSJ lokalisiertes TM-Protein.

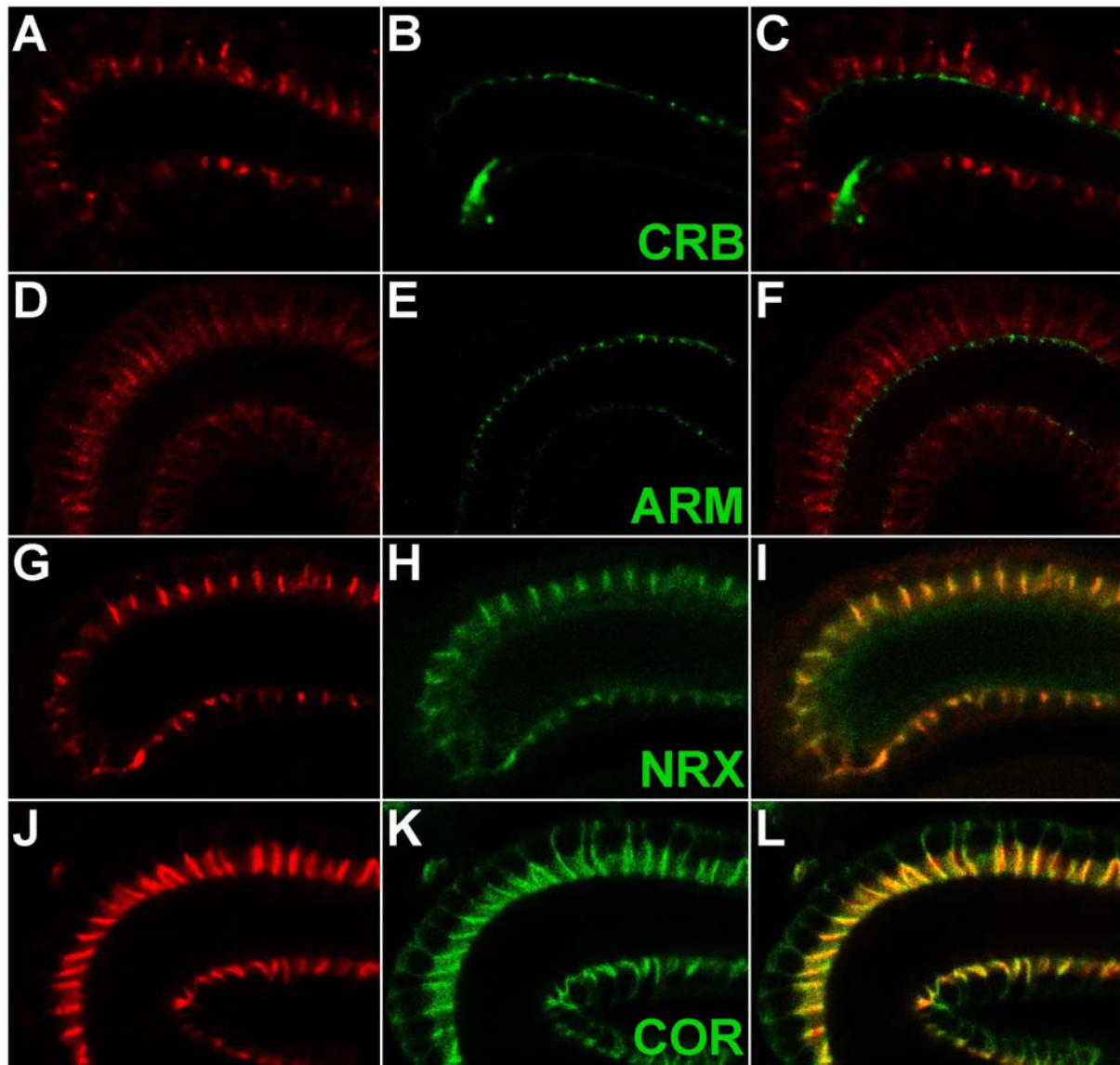


Abb.2.10: MEGA ist in den SJ an der lateralen Zellmembran lokalisiert. Fluoreszenzkolokalisationsstudien (C,F,I,L) an Hinterdarmzellen von st 16 WT Embryonen mit **MEGA** (A,D,G,J rot), **CRB** (B, grün), **ARM** (E, grün), **NRX** (H, grün) und **COR** (K, grün). **(A-C)**: Die Lokalisationsstudie von **MEGA** (A) und **CRUMBS** (B) zeigt keine Kolokalisation (C) in der Marginalen Zone. **(D-F)**: **MEGA** ist auch nicht in der Zonula Adherens detektierbar, da **MEGA** (D) und **ARM** (E) nicht miteinander kolokalisiert sind (F). **(G-I)**: **MEGA** (G) ist jedoch mit **NRX** (H), einem spezifischen pSJ Marker, **kolokalisiert** (I, orange). **(J-L)**: Dies wird durch die gemeinsame Lokalisation (L, orange) von **MEGA** (J) und **COR** (K), das in den pSJ stark konzentriert vorzufinden ist, bestätigt.

2.3 Charakterisierung der *mega* Mutanten

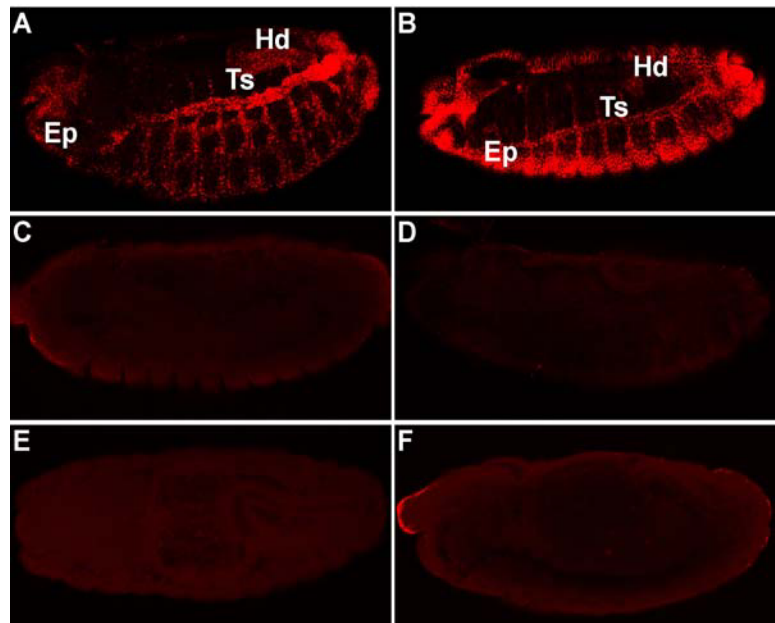
2.3.1 *mega*^{G0012} und *mega*^{G0044} sind amorphe Nullmutanten

Verschiedene Experimente zeigen, dass *mega*^{G0012} und *mega*^{G0044} amorphe *mega* P-Allele sind. So führen beide P-Integrationen bereits zum Ende der Embryogenese zur Letalität homozygot mutanter Tiere (eigene Beobachtung, Peter et al., 2002), wie dies auch bei *Df(1)sta* (*mega*^{Df(1)sta}, siehe 4.6.18) *mega* defizienten Mutanten der Fall ist. Die P-Integration bei *mega*^{G0012} ist für den letalen Phänotyp verantwortlich, da eine Remobilisierung des P-Elements zu lebensfähigen revertanten Tieren führt (persönliche Mitteilung U. Schäfer). Des Weiteren sind die Ausprägungen der trachealen Defekte (siehe 2.4.2) und der epithelialen Barrierefunktion (siehe 2.4.6) in mutanten Embryonen beider P-Linien sowie in *mega*^{Df(1)sta} defizienten Embryonen gleich. Darüber hinaus lassen sich in Expressionsstudien an mutanten Embryonen beider P-Linien weder *mega* mRNA (Abb.2.11,C,E) noch MEGA Protein (Abb.2.11,D,F) nachweisen. Somit handelt es sich bei beiden P-Linien um *mega* Nullallele.

Abb.2.11: In *mega*^{G0012} und *mega*^{G0044}

mutanten Embryonen ist weder *mega* mRNA noch Protein detektierbar.

Gezeigt sind Fluoreszenz *mega* antisense-RNA *in situ* Studien (A,C,E) und anti-MEGA Antikörper Fluoreszenzfärbungen (B,D,F) an WT (A,B), *mega*^{G0012} (C,D) und *mega*^{G0044} (E,F) mutanten st14 Embryonen in ventraler Ansicht (Ausnahme E in dorsal). **(A-B):** Im WT ist die *mega* mRNA (A) und das MEGA Protein (B) in ektodermalen Geweben verteilt. **(C-D):** In mutanten Embryonen von *mega*^{G0012} ist weder *mega* mRNA (C) noch MEGA Protein (D) detektierbar. **(E-F):** Ebenso



wenig ist in *mega*^{G0044} Embryomutanten die *mega* mRNA (E) oder das MEGA Protein (F) sichtbar. Epidermis (Ep), Hinterdarm (Hd), Tracheensystem (Ts).

2.3.2 *mega*^{EA97} und *mega*^{VE896} sind hypomorphe *mega* Allele

Im Gegensatz zu den *mega* P-Linien handelt es sich bei den EMS induzierten Mutantenlinien nicht um Nullmutanten. Die Mutation in *mega*^{VE896} wirkt sich embryonal letal aus. Sowohl der

tracheale Phänotyp als auch die epitheliale Barrierefunktion mutanter Embryonen sind in ihrer Ausprägung von *mega*^{Df(1)sta} defizienten Embryonen nicht zu unterscheiden. Trotzdem ist in *mega*^{VE896} mutanten Embryonen eine WT ähnliche Transkription des *mega* Gens zu beobachten (Abb.2.12,C). Sequenzanalysen zeigen, dass die EMS Mutation in der zweiten TM-Domäne (Abb.2.13,A) des MEGA Proteins einen As-Austausch (Abb.2.2,B) bewirkt hat. Tatsächlich ist das MEGA Protein in EMS induzierten *mega* mutanten Embryonen nicht in die Zellmembran inkorporiert, sondern im Zytoplasma mislokalisiert (Abb.2.13,C,D). Offensichtlich handelt es sich bei *mega*^{VE896} um ein stark hypomorphes Allel.

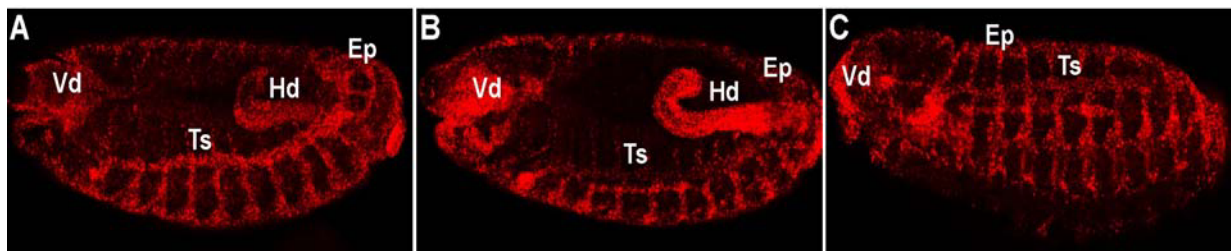


Abb.2.12: *mega* mRNA ist in mutanten Embryonen von *mega*^{EA97} und *mega*^{VE896} WT ähnlich exprimiert. *mega* Fluoreszenz antisense-RNA *in situ* Studie an st14 WT (A), *mega*^{EA97} (B) und *mega*^{VE896} (C) Embryonen in ventraler (A,B) und ventrolateraler Ansicht (C). **(A):** Im WT ist *mega* in ektodermalen Epithelien exprimiert (siehe auch Abb.2.6). **(B,C):** In mutanten Embryonen von *mega*^{EA97} (B) und *mega*^{VE896} (C) ist ein WT ähnliches *mega* mRNA-Expressionsmuster zu beobachten. Epidermis (Ep), Hinterdarm (Hd), Tracheensystem (Ts), Vorderdarm (Vd).

Die EMS induzierte Mutation der Linie *mega*^{EA97} wirkt sich ebenfalls letal aus. Jedoch scheint es sich bei *mega*^{EA97} um ein schwächeres hypomorphes Allel zu handeln. Ca. 37% (11 von 29) der homozygot mutanten Embryonen schlüpfen als Larven und überleben bis in das dritte Larvenstadium. Außerdem sind schwächere Phänotypen im Tracheensystem (siehe 2.4.2) und an der epithelialen Barrierefunktion (siehe 2.4.6) zu beobachten. Wie schon bei *mega*^{VE896}, so ist auch bei *mega*^{EA97} mutanten Embryonen eine normale *mega* mRNA-Expression detektierbar (Abb.2.12,B). Die Mutation in *mega*^{EA97} bewirkt zwar einen As-Austausch in der ersten extrazellulären Schleife von MEGA (Abb.2.13,A; Abb.2.2,B), das Protein ist jedoch unverändert in den pSJs lokalisiert (Abb.2.13,E).

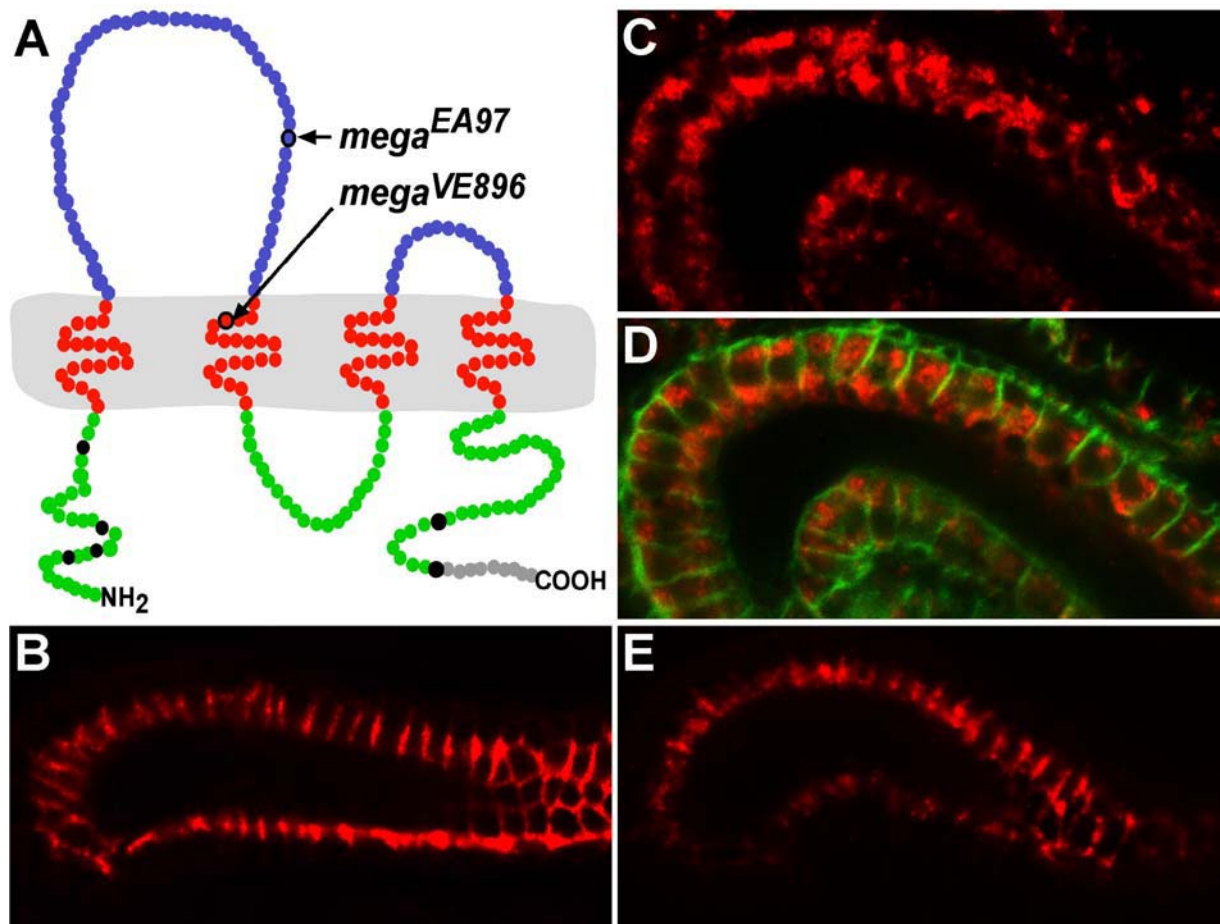


Abb.2.13: Die EMS induzierten Mutationen und die zelluläre MEGA Lokalisation. Gezeigt sind **anti-MEGA** (B-E **rot**) und **anti- α -SPECTRIN** (D, **grün**) Fluoreszenzantikörperfärbungen an Hinterdarmzellen von WT (B) und *mega*^{VE896} (C,D) bzw. *mega*^{EA97} (E) mutanten st16 Embryonen. **(A):** Darstellung der Punktmutationen im MEGA^{EA97} bzw. MEGA^{VE896} mutanten Protein. Eine chemisch induzierten EMS Mutagenese hat in *mega*^{EA97} und *mega*^{VE896} zu Punktmutationen geführt, die jeweils zu einen Nukleotidaustausch und damit zu einem As-Austausch führten (Abb.2.2,B). Bei MEGA^{EA97} befindet sich der As-Austausch im Bereich der ersten extrazellulären Schleife und bei MEGA^{VE896} in der zweiten TM-Domäne. **(B):** MEGA ist im WT in den pSJ lokalisiert. **(C,D):** Das mutante MEGA^{VE896} Protein ist im Zytoplasma mislokalisiert. Eine Kolo-kalisation von MEGA^{VE896} mit dem Membranmarker α -SPECTRIN ist nicht zu beobachten. **(E):** MEGA^{EA97} ist trotz der Mutation in den pSJ lokalisiert.

2.4 Die embryonale *mega* Funktion

2.4.1 Die *mega* P-Mutanten zeigen eine veränderte Tracheenmorphologie

In *mega*^{G0012} (Abb.2.14,B) und *mega*^{G0044} mutanten Embryonen erscheint das Tracheensystem stark wellenförmig. Derselbe Phänotyp ist auch an *mega*^{Df(1)sta} defizienten Embryonen zu beobachten (Abb.2.14,C). Um zu überprüfen, ob der Tracheenphänotyp durch die P-induzierte Mutationen verursacht wird, wurden transheterozygote Weibchen von *mega*^{G0012} mit dem *mega*^{Df(1)sta} Defizienzallel kombiniert (siehe 4.6.6). Die transheterozygoten Weibchen sind letal und besitzen ebenfalls den wellenförmigen Tracheenphänotyp (Abb.2.14,D). Dies bestätigt, dass die P-Element Integration in *mega*^{G0012} für den Tracheenphänotyp der Embryomutanten verantwortlich ist.

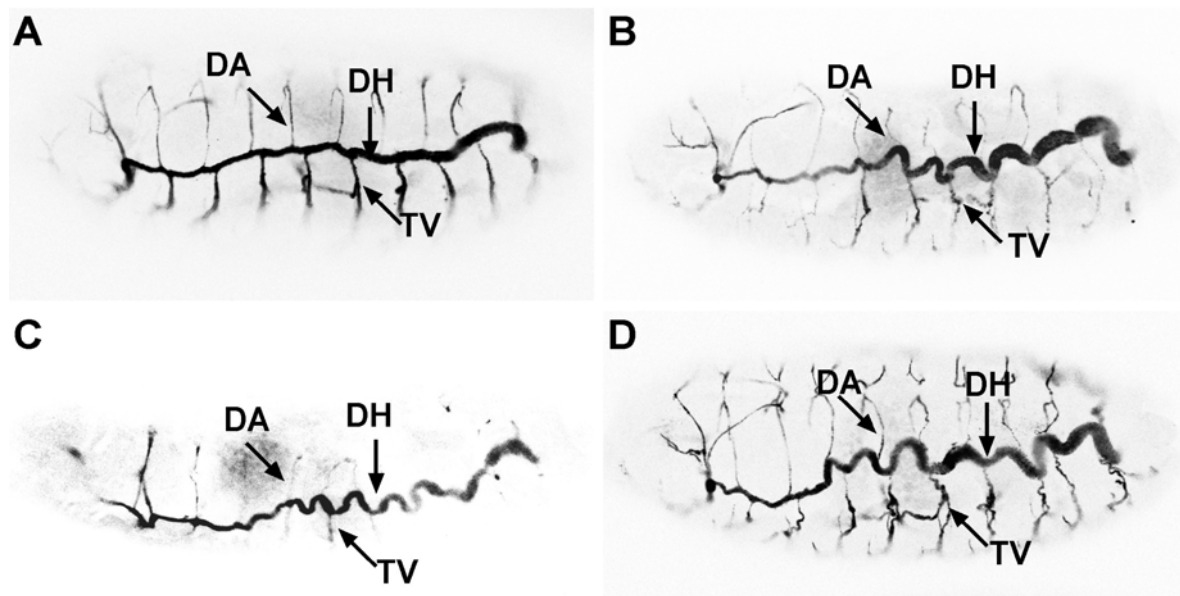


Abb.2.14: *mega* ist an der morphogenetischen Ausbildung der Tracheenäste beteiligt. Fluoreszenz-2A12 Antikörperfärbungen an WT (A), *mega*^{G0012} (B), *mega*^{Df(1)sta} (C) und *mega*^{G0012}/*mega*^{Df(1)sta} (D) mutanten st16 Embryonen in ventraler Ansicht. **(A):** Der WT-Embryo besitzt gerade ausgewachsene dorsale und ventrale Primäräste (Pfeile). **(B,C):** *mega*^{G0012} Mutantenembryonen (B) und *mega*^{Df(1)sta} defiziente Embryonen (C) besitzen stark gebeugte, wellenförmige Tracheenäste. Der Phänotyp ist besonders gut im dorsalem Hauptstamm (DH) und den transversalen Verbindungen (TV) zu erkennen (Pfeile). **(D):** Der mutante Tracheenphänotyp (Pfeile) wurde bei transheterozygoten Weibchen durch das Einkreuzen der *mega*^{G0012} P-Mutationen erzeugt. dorsaler Ast (DA), dorsaler Hauptstamm (DH), transversale Verbindung (TV).

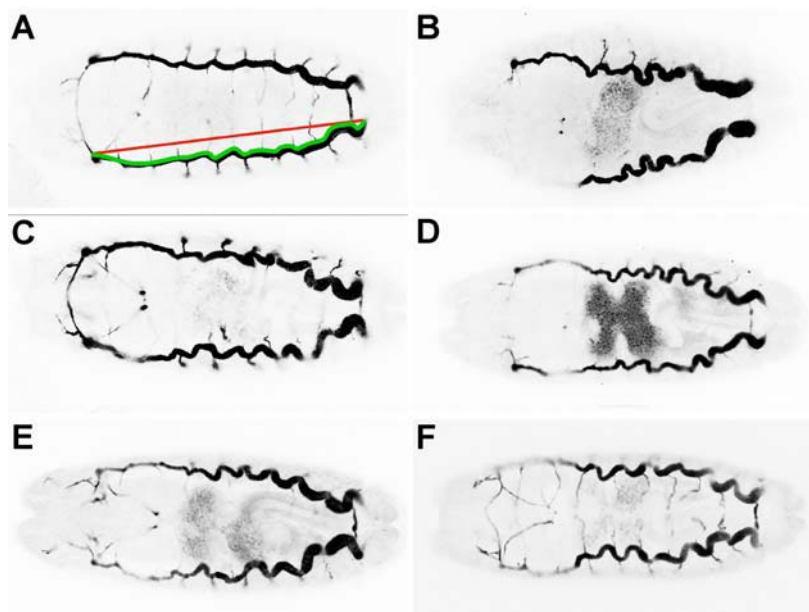
2.4.2 In *mega* Mutanten sind Länge und Durchmesser der Tracheenäste verändert

Da das Tracheensystem innerhalb eines Embryos eine definierte Größe einnimmt (Kühnlein et al., 1996) ist der wellenförmige Tracheenphänotyp vermutlich die Konsequenz aus

verlängerten primären Ästen, die sich im Embryo nicht genügend ausdehnen können. Um zu überprüfen, in welchem Maße die Äste in *mega* Mutanten verlängert sind, wurde die Länge der DH, von WT und *mega* mutanten Embryonen im st16 gemessen und miteinander verglichen (siehe 4.6.16; Abb.2.15). Dies wurde zuerst an DH (n=20) von WT Embryonen durchgeführt und der hierbei ermittelte Durchschnittswert als 100% DH Länge definiert. Im Vergleich zum WT (Abb.2.15,A), beträgt die durchschnittliche DH Länge von *mega*^{EA97} (n=17) 126% (Abb.2.15,B). Die DH mutanter *mega*^{VE896} (n=18), *mega*^{G0012} (n=18), *mega*^{G0044} (n=16) und *mega*^{Df(1)sta} (n=13) defizienten Embryonen sind gleich stark betroffen, sie haben eine Länge von 137% (Abb.2.15,C-F).

Abb.2.15: Die dorsalen Hauptstämme sind in *mega* Mutanten länger als in WT Embryonen. Dorsale Ansicht von 2A12 Antikörperfärbungen an WT (A), *mega*^{EA97} (B), *mega*^{VE896} (C), *mega*^{G0012} (D), *mega*^{G0044} (E) und *mega*^{Df(1)sta} (F) st16 Embryonen.

(A): WT Embryo besitzen einen gerade ausgewachsenen DH. Um die Längenunterschiede am DH verschiedener WT und *mega* mutanter Embryonen vergleichen zu können, wurde der Abstand zwischen anteriorem und posteriorem Ende eines DHs bestimmt (rote Linie) und von seiner tatsächlichen Länge (grüne Linie) subtrahiert. Die ermittelte Differenz beschreibt so den zusätzlichen Weg den ein DH von posterior nach anterior durchläuft, unabhängig von natürlichen Größenunterschieden einzelner Embryonen. (B): Verglichen mit WT Embryonen ist der DH bei *mega*^{EA97} Mutanten um durchschnittlich 26% länger. (C-F): In mutanten Embryonen von *mega*^{VE896} (C), *mega*^{G0012} (D), *mega*^{G0044} (E) und der *mega*^{Df(1)sta} Defizienz (F) ist ein DH sogar um durchschnittlich 37% verlängert. Interessanterweise erstreckt sich der wellenförmige Phänotyp der DH hauptsächlich über die posterior gelegenen Tracheenmetamere.



2.4.3 *mega* ist an der Ausbildung der Tracheenzellform beteiligt

Zwei unterschiedliche Möglichkeiten sind für ein verändertes Astwachstum denkbar. Einerseits könnte z.B. eine größere Anzahl der Tracheenzellen zum verstärkten Längenwachstum beitragen, andererseits ist auch eine veränderte Tracheenzellform als Ursache für die längeren Äste denkbar. Beitel und Krasnow (2000) zeigten jedoch anhand mutanter Embryonen, dass eine veränderte Anzahl der Tracheenzellen die Morphologie der Tracheenäste nicht beeinflusst (siehe 1.5). Außerdem beschreiben die Autoren, dass

Embryomutanten mit verlängerten Tracheenästen eine normale Tracheenzellanzahl besitzen.

Es ist daher anzunehmen, dass die Zellform eine entscheidende Rolle zur Ausbildung der Tracheenmorphologie spielt. Beitel und Krasnow (2000) fanden heraus, dass insbesondere die apikale Zellseite für die Bestimmung der Lumengröße trachealer Äste wichtig ist. Dies konnte an mutanten Embryonen von *grh* bestätigt werden, die stark vergrößerte apikale Zellseiten und dadurch längere Tracheenäste besitzen (Hemphälä et al., 2002).

Um die apikale Zellseite und die Form der Tracheenzellen erfassen zu können, wurden mittels konfokaler Mikroskopie (siehe 4.6.14) optische Z-Achsenschnitte entlang der DH an Embryonen im st16 durchgeführt. Zur Bestimmung der Zellform wurde die Länge und Breite der Zellen bemessen (siehe 4.6.16). Im WT unterscheidet sich die Länge ($4,7\ \mu\text{m}$) der DH-Zellen (Anzahl $n=58$) kaum von ihrer Breite ($4,0\ \mu\text{m}$; Abb.2.16,C), die Zellen besitzen eine sehr kompakte Form (Abb.2.16,A). In *mega*^{VE896} Embryomutanten sind die DH-Zellen ($n=48$) jedoch deutlich länger ($6,3\ \mu\text{m}$) als breit ($3,3\ \mu\text{m}$) (Abb.2.16,C). Im Vergleich zum WT offenbaren *mega* Mutanten eine gestreckte Tracheenzellform (Abb.2.16 vgl. A mit B).

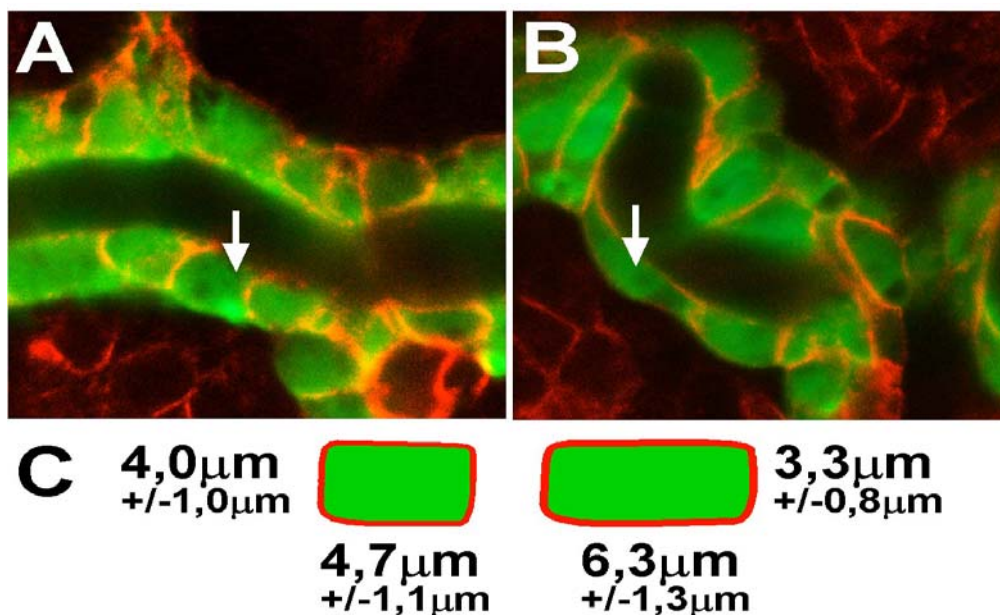


Abb.2.16: Die Form der Zellen des dorsalen Hauptstammes ist in *mega* Embryomutanten verändert. Anti- β -GALACTOSIDASE (GAL, grün) und anti- α -SPECTRIN (rot) Antikörperdoppelfärbungen an *1eve1* (A) und *mega*^{VE896};*1eve1* (B) Embryonen im st16. Bei *1eve1* handelt es sich um eine *P-lacZ* Insertion im Enhancer Bereich des *trachealess* Gens, so dass mit Hilfe einer anti- β -GAL Färbungen alle Tracheenzellen sichtbar gemacht werden können. **(A):** Im WT sind apikale und laterale Zellseite ähnlich groß und die Zellform ist kompakt (Pfeil). **(B):** In *mega*^{VE896} mutanten Embryonen ist die apikale Zellseite größer als die laterale, die Zellenform erscheint gestreckt (Pfeil). **(C,D):** Schematische Darstellung der Zellform von DH-Zellen. Im Durchschnitt sind die kompakten WT Zellen (C) im DH $4,0\ \mu\text{m}$ ($\pm 1,0\ \mu\text{m}$) breit und $4,7\ \mu\text{m}$ ($\pm 1,1\ \mu\text{m}$) lang. In *mega* mutanten Embryonen erscheint die Zellenform gestreckt (D) sind $3,3\ \mu\text{m}$ ($\pm 0,8\ \mu\text{m}$) breit und $6,3\ \mu\text{m}$ ($\pm 1,3\ \mu\text{m}$) lang.

2.4.4 Das Aktin- und Mikrotubulizytoskelett ist in *mega* Mutanten normal verteilt

Die Tracheenzellen besitzen in WT Embryonen eine sehr kompakte Form, während sie in *mega* mutanten Embryonen gestreckt erscheinen (Abb.2.16). Möglicherweise bewirkt eine Veränderung im Zytoskelett die gestreckte Zellform im DH von *mega* Mutanten.

Anhand der trachealen Expression des „Grün-Fluoreszierenden-Proteins“ (GFP) wurde mit Hilfe des UAS-GAL4-System (Brand und Perrimon, 1993), dem Treiber *btl*-GAL4 und der UAS-*aktin*-GFP und UAS-*tau-myc*-GFP Linien (Brand, 1999) die Verteilung von Filamentösem-(F)-Aktin- und des Mikrotubulizytoskeletts an lebenden Embryonen sichtbar gemacht. Im WT sind sowohl F-Aktin- als auch das Mikrotubulizytoskeletts apikal angereichert (Abb.2.17,A,B; Baum und Perrimon, 2001; Lee und Kolodziej, 2002). In *mega*^{G012} mutanten Embryonen ist keine Veränderung zu bemerken, die Verteilung und auch die Expressionsstärke der Zytoskelettkomponenten sind normal (Abb.2.17,D,E).

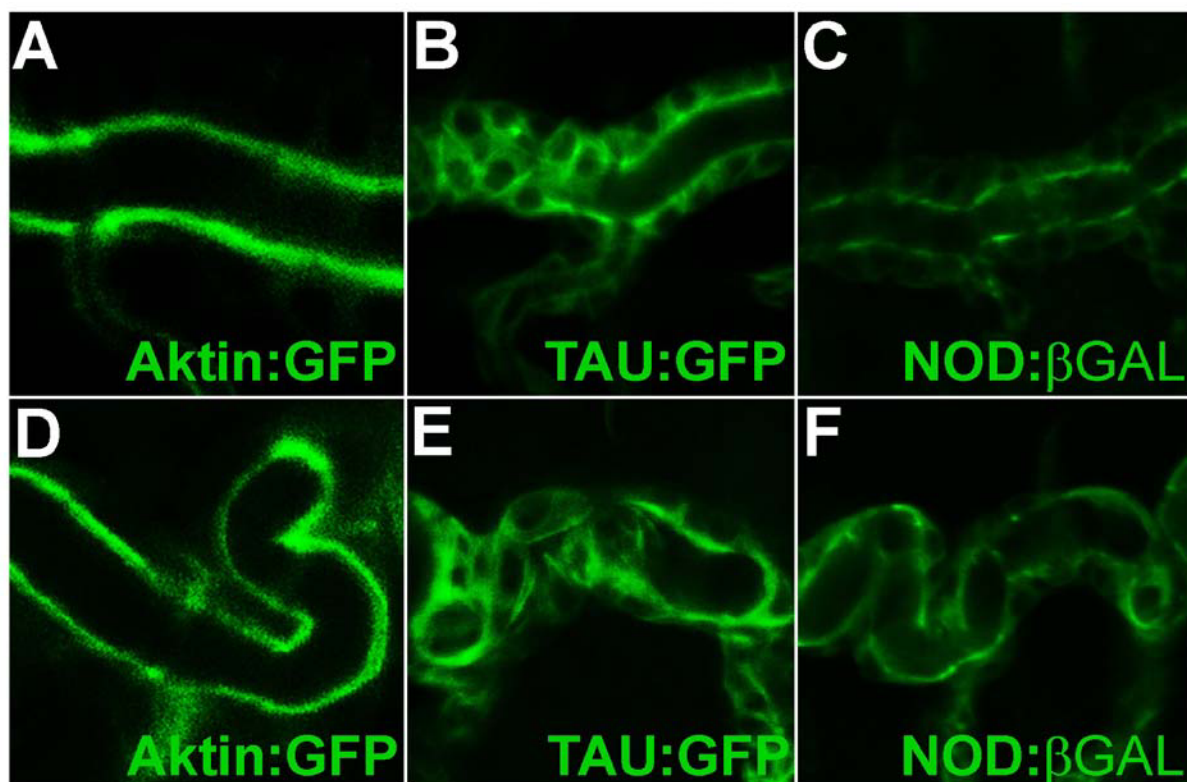


Abb.2.17: Verteilung von Zytoskelettkomponenten im Tracheensystem von WT und *mega* mutanten Embryonen. Gezeigt ist die GFP Verteilung im Tracheensystem lebender WT (A,B) und *mega*^{G0012} mutanter Embryonen im st16, die *btl*-GAL4 und UAS-*aktin*-GFP (A,D) oder UAS-*tau-myc*-GFP (B,E) tragen. In C,F ist die anti-β-GAL Fluoreszenzantikörperfärbung im Tracheensystem von WT (C) und *mega*^{G0012} (F) mutanten st16 Embryonen, die den *btl*-GAL4 Treiber und UAS-*nod-lacZ* besitzen, zu sehen. Das NOD:β-GAL Fusionsprotein ist ein Marker für die apikal lokalisierten Mikrotubuli Minus Enden. **(A,B):** Im WT Tracheensystem akkumulieren Aktin- (A) und Mikrotubuli- (B) Zytoskelettkomponenten an der apikalen Zellseite. **(D,E):** In mutanten *mega*^{G0012} Embryonen ist die Aktin- (D) und die Mikrotubuli- (E) Verteilung und deren Expressionsstärke normal. **(C,F):** In WT Embryonen (C) und in *mega*^{G0012} Mutanten (F) sind die Mikrotubuli Minus Enden apikal orientiert.

Da MEGA im apikolateralen Bereich der Zellmembran lokalisiert ist (Abb.2.10), könnte es möglicherweise die Orientierung des Mikrotubuli Zytoskeletts beeinflussen. NOD ist ein KINESIN verwandtes Motorprotein in *Drosophila*. Das Fusionsprotein NOD:β-GAL eignet sich daher als Marker für die apikal lokalisierten Minus Enden von Mikrotubuli (Clark et al., 1997) und wurde mit Hilfe der Linien UAS-*nod-lacZ* und *btl-GAL4* in den Tracheenzellen angestellt. Im WT und auch in *mega* mutanten Embryonen ist NOD:β-GAL an der apikalen Tracheenzellseite lokalisiert (Abb.2.17,C,F).

Weder die Verteilung noch die Expressionsstärke oder die Orientierung verschiedener Zytoskelettkomponenten scheinen in *mega* mutanten Embryonen betroffen zu sein und sind daher vermutlich nicht der Grund für die Zellformänderungen.

2.4.5 MEGA ist nicht an der Polarisierung epithelialer Zellen beteiligt

Die Festlegung der Polarität epithelialer Gewebe erfolgt in der *Drosophila* Embryogenese bereits sehr früh während der Gastrulation und der Keimstreifenverkürzung (siehe 1.2; Bilder et al., 2003; Knust und Bossinger, 2002; Müller, 2003; Tepass, et al., 2001). Alle an der Polarisierung beteiligten Proteine sind an der lateralen Membran lokalisiert (siehe 1.2.1). So sind das TM-Domänen Protein CRB (Tepass und Knust, 1993; Tepass, 1996) und das PDZ-Domänen Protein *DmPAR-6* apikolateral an die Membran im Bereich der MZ (siehe 1.2.1 Petronczki und Knoblich, 2001; Tepass und Knust, 1993; Tepass, 1996) und das Zelladhäsionsprotein ARM an der ZA angelagert (siehe 1.2.1; Cox et al., 1996; Müller und Wieschaus, 1996; Riggelman et al., 1990). Der Verlust oder die Veränderung der Zellpolarität führt zur Mislokalisierung dieser Proteine. Es wurde daher überprüft, ob die maternale MEGA Komponente möglicherweise an der Initiation oder aber zygotisch gebildetes MEGA am Erhalt der Zellpolarität beteiligt sind. Hierfür wurden Lokalisationsstudien mit den oben beschriebenen Polaritätsmarkern an maternalen (siehe 4.6.5) und/oder zygotischen *mega* mutanten Embryonen durchgeführt.

CRB besitzt in maternal und/oder homozygot *mega*^{G012} (Abb.2.18,B,C) und auch in den *mega*^{VE896} EMS (Abb.2.18,D) induzierten Embryomutanten eine normale Lokalisation. Wie CRB, so sind auch *DmPAR6* und ARM in maternal zygotisch *mega*^{G012} mutanten Embryonen unverändert apikolateral verteilt. (Abb.2.18,F,H). In *mega* mutanten Embryonen sind die Tracheenäste verlängert und erscheinen wellenförmig. Dieser Phänotyp wird wahrscheinlich aufgrund der veränderten Tracheenzellform verursacht. Die Lokalisation von CRB in Tracheenzellen von maternal zygotisch *mega* mutanten Embryonen ist während der frühen und späten Tracheenentwicklung normal (Abb.2.18,I-L). Daher besitzen die Tracheenzellen trotz veränderter Form in *mega* Mutanten eine normale Polarität.

Weder der Verlust der zygotischen noch der maternal zygotischen MEGA Komponente verursachten eine abgeänderte Mislokalisierung verschiedener Polaritätsmarker, was darauf hindeutet, dass die MEGA Komponente keine Rolle bei der Initiation oder dem Erhalt der Zellpolarität spielt.

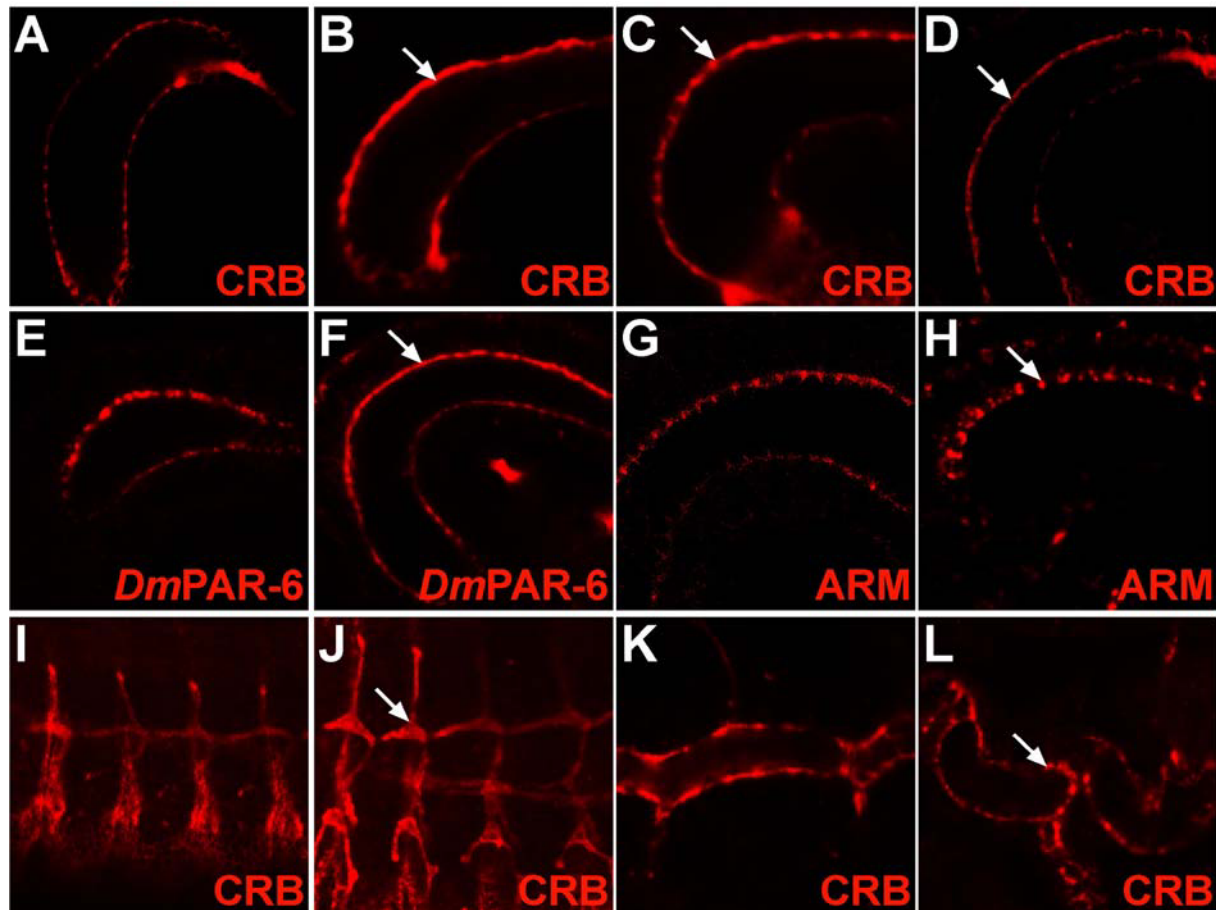


Abb.2.18: MEGA ist nicht an der Ausbildung und dem Erhalt der Zellpolarität beteiligt. Zu sehen sind anti-CRB (A-D; I-L), anti-DmPAR-6 (E,F) und anti-ARM (G,H) Fluoreszenzantikörperfärbungen an WT (A,E,G,I,K), an maternal zygotisch *mega*^{G0012} mutanten (B,F,J,L), an *mega*^{G0012} mutanten (C,H) und an *mega*^{VE896} mutanten st14 Embryonen an Hinterdarmzellen (A-H) und im Tracheensystem (I-L). **(A-D):** CRB ist im WT (A) apikal an der lateralen Membran lokalisiert. Aber auch in maternal zygotisch (B) und zygotisch (C) *mega*^{G0012}, und in *mega*^{VE896} (D) mutanten Embryonen ist CRB normal verteilt (Pfeile). **(E,F):** DmPAR-6 ist sowohl in WT (E) als auch in maternal zygotisch *mega*^{G0012} mutanten Embryonen (F, Pfeil) apikolateral platziert. **(G,H):** Das Zelladhäsionsprotein ARM ist in WT (G) aber auch in *mega*^{G0012} (H, Pfeil) mutanten Embryonen in der ZA lokalisiert. **(I-L):** Eine veränderte CRB Verteilung ist weder zur frühen (I,J, st13) noch zur späten (K,L, st16) Tracheenentwicklung an WT (I, K) und maternal zygotisch *mega*^{G0012} mutanten Embryonen zu detektieren (J,L, Pfeile).

2.4.6 MEGA ist an der Barrierefunktion epithelialer Zellen beteiligt

Claudine sind die Hauptbestandteile der Tight Junctions (TJs; Furuse et al., 1998b; Gow et al., 1999; Morita et al., 1999b). Die TJs sind in der apikolateralen epithelialen Membran

lokalisiert und bilden eine Art segeltuchförmige extrazelluläre Struktur aus (Furuse et al., 1998a; Morita et al., 1999a). Dabei errichten sie eine extrazelluläre Barriere, die parazellulären Transport kontrolliert (Barrierefunktion; engl. „barrier function“; Gow et al., 1999, Simon et al., 1999; Sonoda et al., 1999). Mit Hilfe von Claudin-1 Nullmutanten wurde der Verlust der epithelialen Barrierefunktion in der Maus demonstriert (Furuse et al., 2002). In *Drosophila* und anderen Arthropoden gibt es jedoch keine Hinweise für die Existenz von TJs, stattdessen wurden mit den SJs eine funktionell ähnliche Struktur identifiziert (Tepass et al., 2001). Beim Verlust der integralen SJ Proteine NRX und COR ist die epitheliale Barrierefunktion nachhaltig gestört (Baumgartner et al., 1996, Lamb et al., 1998). Interessanterweise ist MEGA, als *Drosophila*-Claudin, in den SJs lokalisiert (Abb.2.10). Eine Überprüfung der Barrierefunktion in *mega* mutanten Embryonen wäre daher neben der Sequenzhomologie ein funktioneller Hinweis der Verwandtschaft von MEGA mit den Claudinen.

Zur Analyse der Barrierefunktion wurde fluoreszierender Farbstoff („Texas-Red[®]-dextran“) mit einem Molekulargewicht von 10kDa in lebende Embryonen injiziert (siehe 4.6.13). Der Farbstoff breitet sich innerhalb weniger Minuten im Körper des Embryos aus. Internalisierte Epithelien, wie z.B. das Tracheensystem und die Speicheldrüsen besitzen ein Lumen im Körperinneren. Um parazellulären Transport zu unterdrücken, bilden sie eine transepitheliale Barriere aus. Aufgrund der Barriere kann der in WT Embryonen und heterozygoten *mega*^{VE896} mutanten Embryonen injizierte Dextran-Farbstoff nicht in das Lumen des Tracheensystems (Abb.2.19,A) und der Speicheldrüsen eindringen (Abb.2.19,E). Ist die Barrierefunktion dagegen gestört, findet ein parazellulärer Transport des Farbstoffs in internalisierte Lumina statt, wie dies an *cor* mutanten Embryonen gezeigt wurde (Lamb et al., 1998; Ward et al., 2001). In *mega*^{Df(1)sta} defizienten Embryonen (Abb.2.19,B,F), in *mega*^{G0012} (Abb.2.19,C,G) und in *mega*^{VE896} (Abb.2.19,D,H) mutanten Embryonen füllt der Farbstoff tatsächlich stets das Lumen von Tracheensystem und Speicheldrüsen aus. Im hypomorphen Allel *mega*^{EA97} ist der Farbstoff jedoch nur in 14 von 21 beobachteten mutanten Embryonen im Lumen beider Organe zu finden.

Eine Untersuchung des zeitlichen Ablaufs der Lumenfüllung zeigte, dass bei *mega*^{G0012} mutanten Embryonen die Farbe im Tracheensystem bereits 3min und in den Speicheldrüsen 10min nach der Injektion zu erkennen ist. Eine maximale Füllung war im Tracheensystem nach 25min und in den Speicheldrüsen nach 45min zu beobachten. Im WT ist innerhalb von 90min kein Anzeichen einer Füllung zu detektieren. Eine hohe (1200x) Ausschnittsvergrößerung zeigt, dass der Dextran-Farbstoff über parazelluläre Wege in die Lumina transportiert wird (Abb.2.19,I).

Der beobachtete parazelluläre Transport des Farbstoffes in die Lumina epithelialer Gewebe zeigt, dass MEGA an der Kontrolle der transepithelialen Barriere beteiligt ist. Ähnlich wie MEGA kontrollieren auch die Claudine die epitheliale Barrierefunktion und demnach besitzen MEGA und die Claudine anscheinend auch funktionelle Ähnlichkeiten.

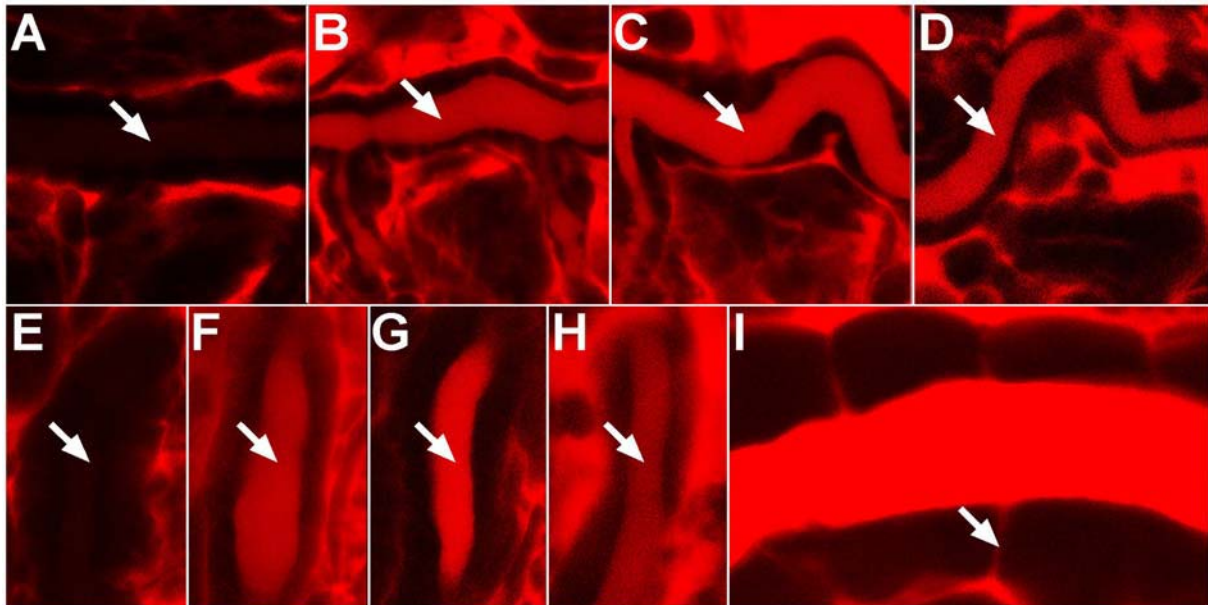


Abb.2.19: MEGA ist an der Barrierefunktion epithelialer Gewebe beteiligt. Um die Barrierefunktion zu überprüfen, wurde 10kDa großer fluoreszierender Texas-Red®-dextran Farbstoff in lebende WT (A,E), in *mega*^{Df(1)sta} defiziente (B,F), in *mega*^{G0012} (C,G,I) und in *mega*^{VE896} (D,H) mutante Embryonen im st16 injiziert. Der Farbstoff breitet sich innerhalb einer Minute im Embryo aus. Gezeigt sind Ausschnitte vom Lumen des Tracheensystems (A-D und I) und der Speicheldrüsen (E-H). **(A, E):** In heterozygoten *mega* mutanten Embryonen (A) und WT Embryonen (E) gelangt innerhalb von 90min nach der Injektion kein Farbstoff durch die epitheliale Barriere in das Lumen des Tracheensystems (A, Pfeil) und der Speicheldrüsen (E, Pfeil). **(B-H):** In homozygot *mega*^{Df(1)sta} defizienten Embryonen (B,F), in *mega*^{G0012} P-Mutanten (C,G) und in *mega*^{VE896} EMS-Mutanten (D,H) ist der Farbstoffe nach 25min im Lumen des Tracheensystems (B-D, Pfeile) und nach 45min im Lumen der Speicheldrüsen (F-H, Pfeile) verteilt. **(I):** Eine Ausschnittsvergrößerung (1200x) an Tracheenzellen zeigt, dass der Farbstoff in *mega*^{G0012} Embryomutanten über parazelluläre Wege (Pfeil) in das Lumen transportiert wird.

2.4.7 MEGA ist für die Ausbildung der SJ Struktur essentiell

Da MEGA in den pSJs lokalisiert ist, wurde analysiert, ob MEGA am Aufbau der pSJ beteiligt ist. Hierfür wurde die zelluläre Lokalisation integraler SJ Komponenten in *mega* Mutanten untersucht. COR, NRX und FAS3 (siehe 1.3.1; Patel et al., 1987) sind im WT in den SJs lokalisiert (Abb.2.20,A-C; Einleitung 1.3.1; Fehon et al., 1994; Woods und Bryant, 1990; Woods et al., 1997). In *mega*^{G0012} mutanten Embryonen sind COR, NRX und FAS3 jedoch nicht nur in den SJs, sondern zusätzlich entlang der basolateralen Membran mislokalisiert (Abb.2.20,D-F). Diese Mislokalisation der SJ Proteine deutet eine mögliche Veränderung der

SJ Struktur in *mega* mutanten Embryonen an. Um daher die Morphologie der pSJs untersuchen zu können wurden, an WT und *mega*^{G0012} mutanten Tracheenzellen elektronenmikroskopische Aufnahmen (siehe 4.6.15) durchgeführt. Im WT besitzen die pSJs der Tracheenzellen ihre charakteristische leiterförmige Septa-Struktur (Abb.2.20,G; Tepass und Hartenstein, 1994). Im Gegensatz zum WT ist die leiterförmige Septa-Struktur in *mega* mutanten Embryonen nicht zu erkennen. Der extrazelluläre Bereich zwischen den Tracheenzellen scheint stattdessen mit unstrukturiertem Material gefüllt zu sein (Abb.2.20,H). Der Verlust der Septa-Struktur zeigt, dass MEGA als integrale pSJ Komponente für die SJ Morphologie notwendig ist.

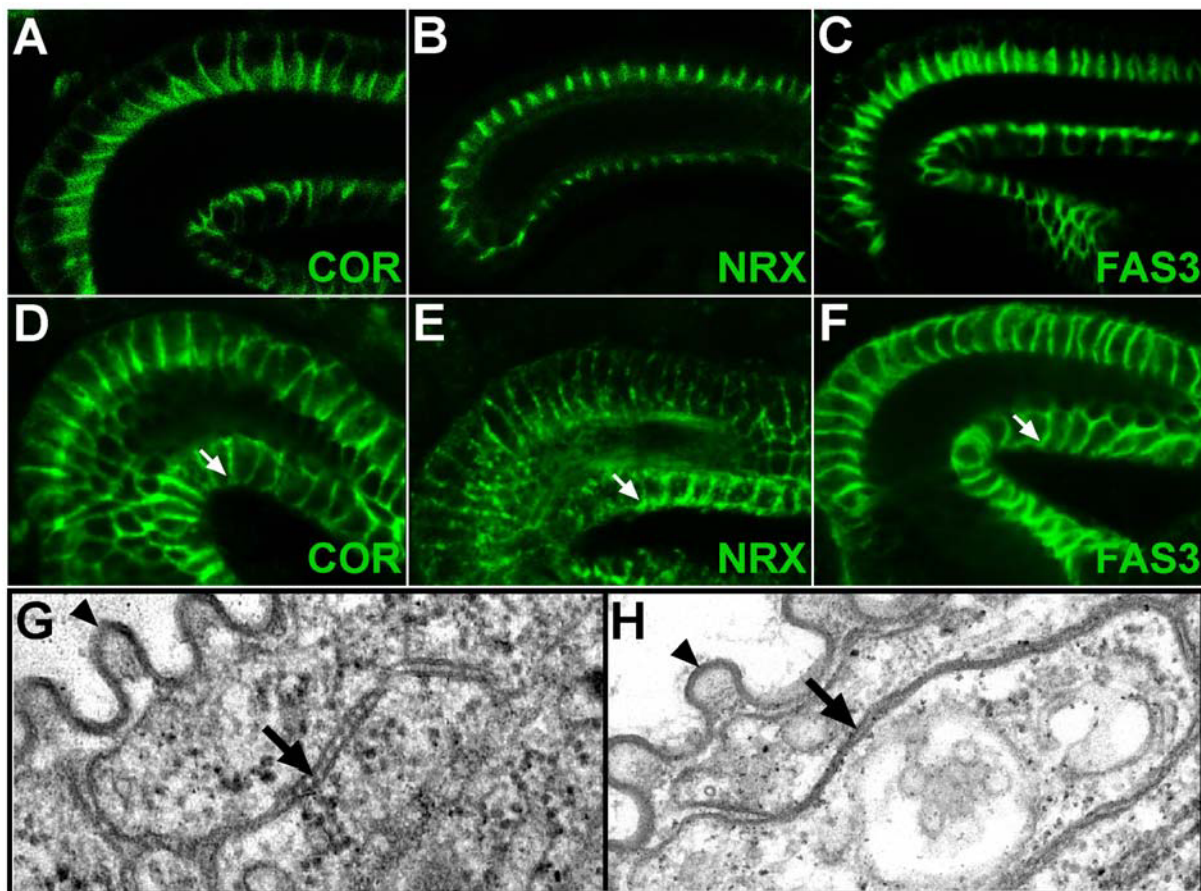


Abb.2.20: MEGA ist für den Aufbau der SJs notwendig. Zu sehen sind anti-COR, anti-NRX und anti-FAS3 Fluoreszenzantikörperfärbungen am Hinterdarm von st16 WT (A-C) und *mega*^{G0012} mutanten (D-F) Embryonen, sowie elektronenmikroskopische Aufnahmen von Tracheenzellen aus WT (G) und *mega*^{G0012} mutanten (H) st17 Embryonen. **(A-C)** In WT Embryonen sind COR (A), NRX (B) und FAS3 (C) in den SJs lokalisiert. **(D-F):** In *mega*^{G0012} sind die integralen SJ Proteine COR (D), NRX (E) und FAS3 (F) neben der SJ Lokalisation basolateral mislokalisiert (Pfeile). **(G,H):** In WT Tracheenzellen (G) besitzen die Septa der pSJs eine leiterförmige Struktur (G, Pfeil). In *mega*^{G0012} mutanten Embryonen (H) ist statt der Septa unstrukturiertes Material im extrazellulären Bereich zu sehen (H, Pfeil). Die taenidialen Falten der Tracheenzellen, die in das Tracheenlumen hinein reichen, sind mit Pfeilspitzen in G und H markiert.

2.5 Die MEGA Lokalisationsabhängigkeit

2.5.1 Die MEGA Lokalisation steht unter der Kontrolle von SINUOUS

mega ist Teil einer Gruppe von Genen, die Länge und Lumendurchmesser trachealer Äste regulieren (Beitel und Krasnow, 2000). Neben *mega* ist bisher keines dieser Gene identifiziert und molekular analysiert worden.

In mutanten Embryonen von *bulbous* (*bulb*), *convoluted* (*conv*), *cystic* (*cys*), *varicose* (*vari*) und *sinuous* (*sinu*) ist ein normales *mega* Expressionsmuster zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Eine Kontrolle der *mega* Genexpression durch eines der Gene ist daher nicht anzunehmen. Außerdem ist das MEGA Protein in mutanten Embryonen von *bulb*, *conv*, *cys*, *vari* normal in den SJs lokalisiert (Abb.2.21,A-E). In *sinuous* (*sinu*) mutanten Embryonen ist dagegen die MEGA Lokalisation nicht nur auf die SJs beschränkt, sondern sie erstreckt sich zusätzlich auf basale Bereiche der lateralen Zellmembran (Abb.2.21,F). Lokalisationsstudien an Hinterdarmzellen und Speicheldrüsen zeigten ebenfalls eine zusätzliche basolaterale Mislokalisierung von MEGA (Abb.2.21 vgl. G mit H und I mit J).

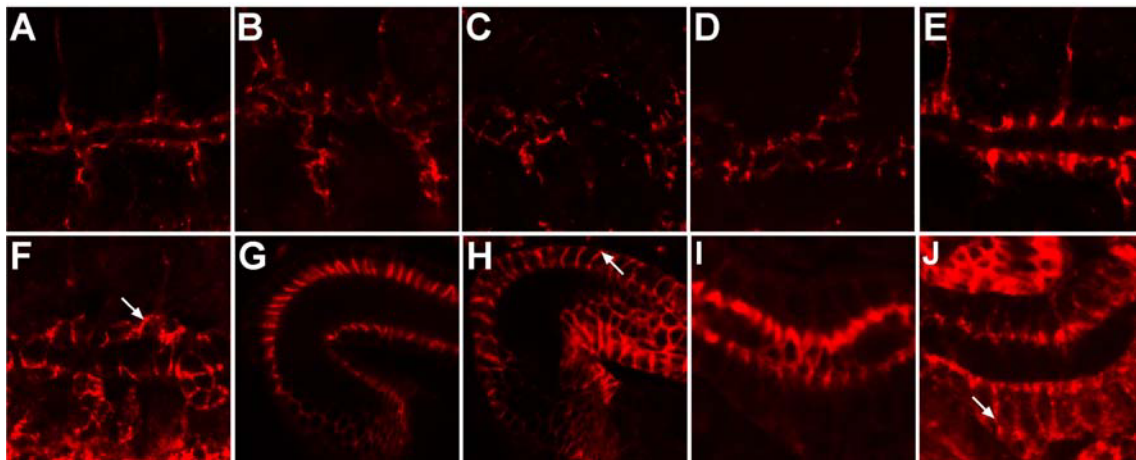


Abb.2.21: Subzelluläre MEGA Lokalisationskontrolle durch Gene, die tracheale Röhrenstrukturen regulieren. Gezeigt sind anti-MEGA Fluoreszenzantikörperfärbungen im Tracheensystem (A-F), im Hinterdarm (G,H) und den Speicheldrüsen (I,J) von WT (A,G,I), *bulb* (B), *conv* (C), *cys* (D), *vari* (E) und *sinu* (F,H,J) mutanten st15 Embryototalpräparaten. **(A):** Im WT ist die MEGA Lokalisation im Tracheensystem auf die SJs beschränkt. **(B-E):** In *bulb* (B), *conv* (C), *cys* (D) und *vari* (E) mutanten Embryonen ist MEGA im Tracheensystem unverändert in den SJs lokalisiert. **(F):** In *sinu* mutanten Embryonen ist MEGA im Tracheensystem zusätzlich zu den SJs basolateralen in der Zellmembran mislokalisiert (F, Pfeil). **(G-H):** Aber auch in Hinterdarmzellen (G,H) und in Zellen der Speicheldrüsen (I,J) ist MEGA, im Gegensatz zum WT (G,I), in *sinu* Mutanten basolateral mislokalisiert (H,J, Pfeile).

Die Mislokalisierung von MEGA in *sinu* mutanten Embryonen deutet eine Beteiligung des SINU Proteins an der gezielten SJ Lokalisierung von MEGA an, während die vier anderen Gene bzw. ihre Genprodukte für die MEGA Lokalisation keine Rolle spielen.

2.5.2 MEGA, CORACLE und NEUREXIN beeinflussen gegenseitig ihre Lokalisation

Das Expressionsmuster von MEGA, COR und NRX ist nahezu identisch (siehe 2.2.6) und sie sind spezifisch in pSJs kolokalisiert (siehe 2.2.7; siehe 1.3.1). Deshalb wurde eine mögliche gegenseitige Abhängigkeit ihrer intrazellulären Proteinlokalisierung analysiert. Während sich die MEGA Lokalisation im WT (Abb.2.22,A) auf den Bereich der SJ beschränkt, ist sie in Embryomutanten von *nrx* (Abb.2.22,B) und *cor* (Abb.2.22,C) zusätzlich basolateral mislokalisiert. Neben COR und NRX ist auch FAS3 eine integrale SJ Komponente (siehe 1.3.1; Woods et al., 1997). In *fas3* (Withlock, 1993) mutanten Embryonen ist MEGA jedoch normal lokalisiert (Abb.2.22,D).

Eine Mislokalisierung von MEGA ist nur in *cor* und *nrx* aber nicht in *fas3* mutanten Embryonen zu beobachten. Offensichtlich scheinen COR und NRX oder aber der COR-NRX-Komplex (Ward et al., 1998; siehe 1.3.1) für die SJ Lokalisation von MEGA wichtig zu sein.

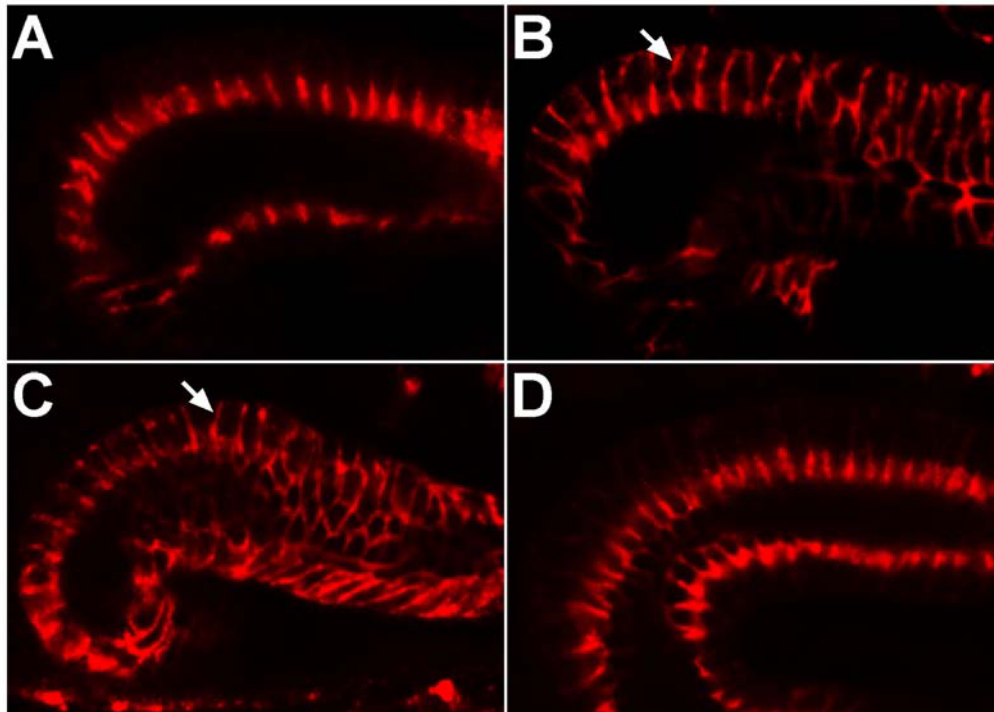


Abb.2.22: Subzelluläre MEGA Lokalisation in Abhängigkeit integraler SJ Proteine. Anti-MEGA Fluoreszenzantikörperfärbung am Hinterdarm von WT (A), *nrx* (B), *cor* (C) und *fas3* (D) mutanten st16 Embryonen. **(A):** Im WT ist MEGA in den SJs lokalisiert. **(B,C):** In *nrx* (B) und *cor* (C) mutanten Embryonen ist die MEGA Lokalisation zusätzlich auf basale Bereiche der lateralen Membran ausgeweitet (Pfeile). **(D):** In mutanten Embryonen von *fas3* bleibt die MEGA Lokalisation auf die SJs beschränkt.

Um zu überprüfen, ob MEGA spezifisch die Lokalisation von COR und NRX beeinflusst, fanden MEGA Überexpressionsstudien im embryonalen Hinterdarm statt. Dies wurde mit Hilfe des UAS-GAL4-Systems (Brand und Perrimon, 1993; UAS-MEGA, G455-GAL4) durchgeführt (siehe 4.6.4). Tatsächlich sind sowohl COR (Abb.2.23,B) als auch NRX (Abb.2.23,E) exakt in den Membranregionen ektopisch zu finden, in denen MEGA überexprimiert ist (Abb.2.23,A-F). Im Gegensatz zu COR und NRX bleibt FAS3 (Abb.2.23,H) jedoch trotz MEGA Überexpression auf die SJs beschränkt (Abb.2.23,G-I).

Die gezielte ektopische COR und NRX Mislokalisierung durch MEGA weist neben den Mutantenanalysen auf eine mögliche direkte oder indirekte Interaktion von MEGA mit dem COR/NRX-Komplex hin.

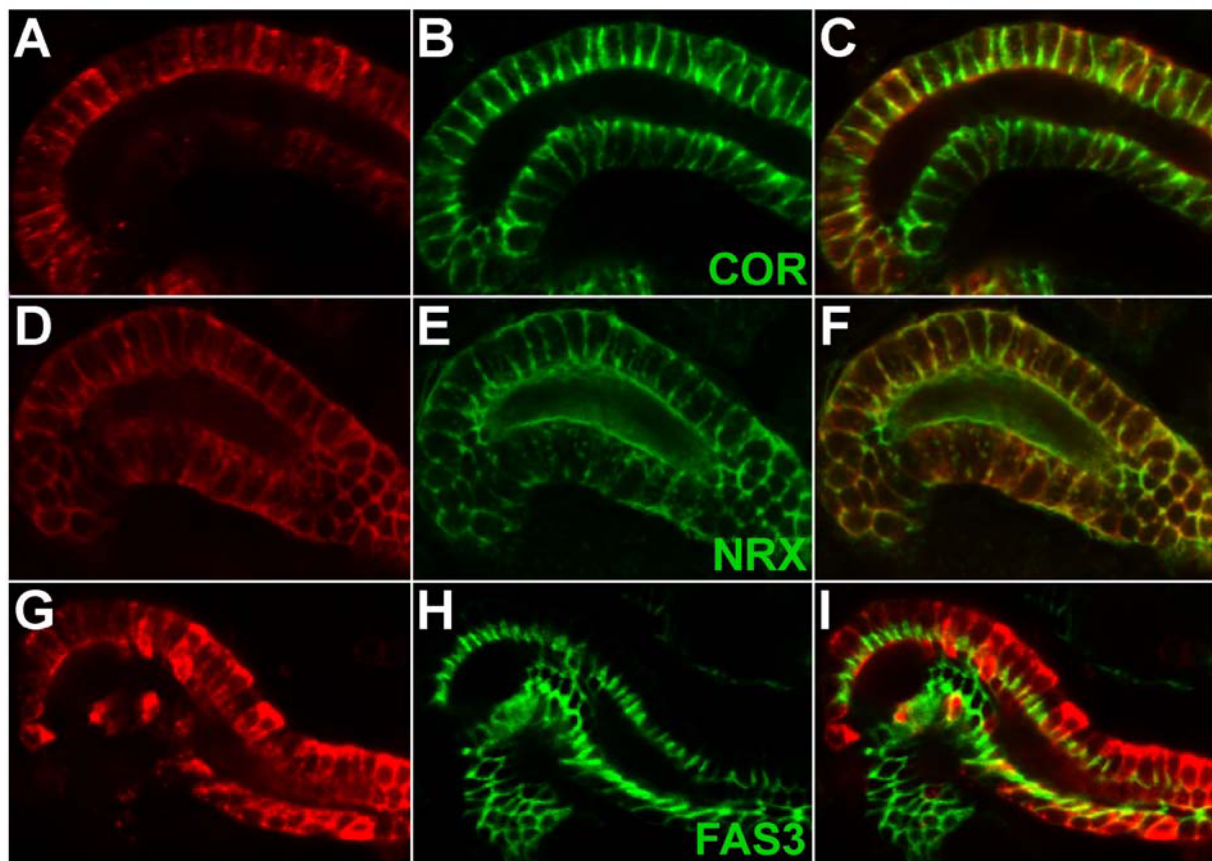


Abb.2.23: Die Überexpression von MEGA führt zur ektopischen Lokalisation von COR und NRX. Fluoreszenzlokalisationsstudien mit anti-MEGA (A-I rot), anti-COR (A-C grün) und anti-NRX (D-F, grün) und anti-FAS3 (G-I, grün) Antikörpern an Hinterdarmzellen von st15 Embryototalpräparaten, die die UAS-MEGA Linie und den G455-GAL4 Treiber tragen. **(A-C):** MEGA ist basolateral in der Membran überexprimiert (A) und induziert in denselben Bereichen eine ektopische Mislokalisation von COR (B), wie auch die Überlagerung der Bilder zeigt (C). **(D-F):** Die Überexpression von MEGA (D) bewirkt eine ektopische NRX Lokalisation (E und F). **(G-H):** Obwohl MEGA basolateral überexprimiert ist (G), bleibt FAS3 Lokalisation normal in den SJs erhalten (H und I).

2.6 Ausblick: MEGA verwandte Proteine in *Drosophila*

Durch Sequenzvergleiche sind in Mensch und Maus mehr als 20 und in Fisch (*Danio rerio*) 15 Claudine gefunden worden (Heiskala et al., 2001; Kollmar et al., 2001; Tsukita und Furuse, 2002). Für die Ausbildung der TJ-Stränge gehen Claudine wahrscheinlich über ihre extrazellulären Schleifen homophile und heterophile Bindungen ein (Furuse et al., 1998a; Furuse et al., 1999; Kubota et al., 1999; Tsukita und Furuse, 2002). Es sind sowohl Anzahl als auch Verhältnis verschiedener Claudine zueinander entscheidend für die Ausbildung der TJ-Stränge und damit für die Integrität der Barrierefunktion (Furuse et al., 1999; Tsukita et al., 2001). Demzufolge ist es wahrscheinlich, dass auch in *Drosophila* mehr als ein Claudin an der Ausbildung der SJs bzw. an der Barrierefunktion beteiligt sein sollte.

Das gezielte Durchsuchen der *Drosophila* Datenbank (BDGP) ergab die Identifizierung zweier putativer Genprodukte (von CG1298 und CG10624) mit einer signifikant hohen Ähnlichkeit zu MEGA. Das CG1298 Genprodukt, weist ca. 35% Identität und 45% Ähnlichkeit mit MEGA auf, während das Genprodukt von CG10624 etwa 30% Identität und 42% Ähnlichkeit mit MEGA besitzt. Der OLR von CG1298 kodiert für ein 264 Aminosäuren großes putatives Protein, und der OLR von CG10624 für ein 243 Aminosäuren großes putatives Protein. Programme zur Strukturanalyse (TMHMM2.0 und DAS) deuten bei beiden Kandidaten eine MEGA bzw. Claudin ähnliche Struktur an. Beide Proteine besitzen 4 TM-Domänen und sowohl eine erste größere als auch eine zweite kleinere extrazelluläre Schleife

Beide Gene offenbaren ein *mega*-ähnliches embryonales Expressionsmuster. Ihre mRNA ist maternal bis in das zelluläre Blastodermstadium verteilt (Abb.2.24,A,G) Erste zygotische Expression ist mit dem Einsetzen der Keimstreifenverkürzung in ektodermalem Gewebe zu beobachten (Abb.2.24,B,H) und dauert bis zum Ende der Embryogenese an (Abb.2.24,E,K). Beide Gene sind in der Epidermis (Abb.2.24,B,H), den Speicheldrüsen, dem Vorderdarm und Hinterdarm (Abb.2.24,D,J), im Tracheensystem (Abb.2.24,C,I) und in Gliazellen der ventralen Mittellinie exprimiert (Abb.2.24,F,L).

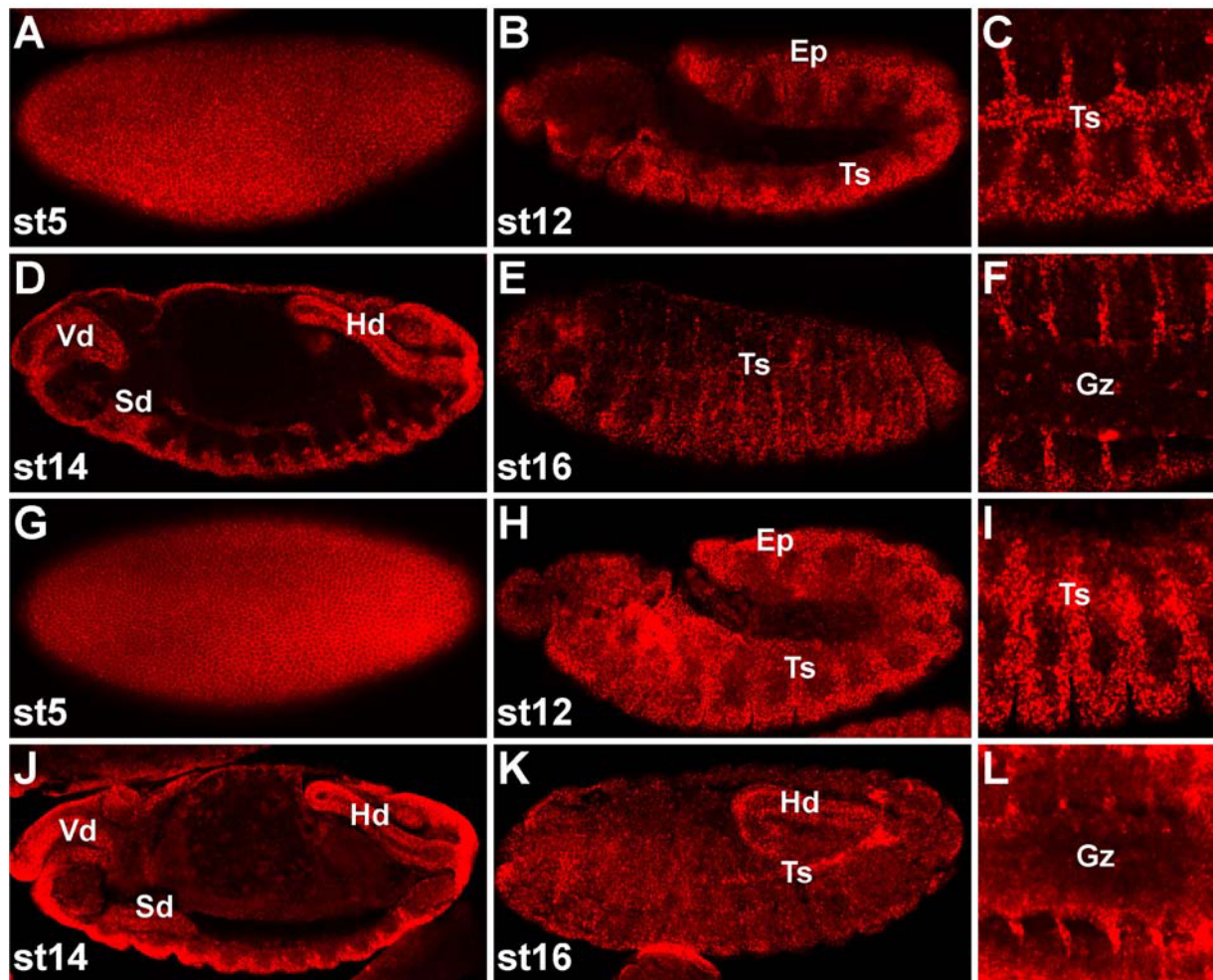


Abb.2.24: Embryonale Expression der *mega* ähnlichen *Drosophila* Gene CG10624 und CG1298. Gezeigt sind Fluoreszenz antisense-RNA *in situ* Hybridisierungsstudien der Gene CG1298 (A-F) und CG10624 (G-L) an WT Embryonen in ventraler Ansicht. Beide Gene sind maternal bis in das zelluläre Blastodermstadium verteilt (A,G). Erste zygotische Expression ist ab der Keimstreifenverkürzung (B, H) zu detektieren und dauert während der Embryogenese an (D,E,J,K). Beide Gene sind wie *mega* in der Epidermis (B,H), den Speicheldrüsen, Vorderdarm und Hinterdarm (D,J), im Tracheensystem (C,I) und in Gliazellen der ventralen Mittellinie (F,L) exprimiert. Epidermis (Ep), Gliazellen (Gz), Hinterdarm (Hd), Speicheldrüsen (Sd), Tracheensystem (Ts), Vorderdarm (Vd).

2.7 Identifizierung und molekulare Charakterisierung von *wurst*

Die beiden P-Linien G0162 und G0328 wurden anhand des wellenförmigen trachealen Phänotyps ihrer mutanten Embryonen identifiziert (siehe 2.1.2). Die P-Elemente von G0162 und G0328 sind in derselben Transkriptionseinheit inseriert. Das betroffene Gen war unbekannt und molekular nicht analysiert. Aufgrund eines markanten mutanten trachealen Phänotyps (siehe 2.9.1) wurde das Gen als *wurst* bezeichnet und die P-Linien *wurst*^{G0162} und *wurst*^{G0328} genannt.

2.7.1 Molekulare Analyse des Gens CG9089

Beide P-Elemente sind in das erste Exon des Gens CG9089 inseriert (Abb.2.25,A). Anhand von Datenbankanalysen (BDGP) wurden von CG9089 zwei ESTs identifiziert (LD21986; RE53344). Beide ESTs wurden bestellt und ihre cDNAs sequenziert. Die überlappenden cDNAs und bekannte genomische Sequenzen (BDGP; Adams et al., 2000) trugen zur Aufklärung der Exon-Intron Struktur des Gens bei.

CG9089 besitzt zwei Exons und ein Intron (Abb.2.25,A) und sein Transkript ist 1823bp groß (Exon1=323bp und Exon2=1500bp; Intron=500bp). Kurz vor dem Transkriptionsstart ist eine TATA-Box Konsensussequenz und direkt vor dem Start eine Initiatorsequenz zu finden (Abb.2.25,B). Innerhalb des Transkriptionsbereichs ist nach 39bp ein Downstream-Promotor-Element vorhanden. Vermutlich handelt es sich dabei um den tatsächlichen Transkriptionsstart. Im Transkript befindet sich ein 1218bp großer OLR, der sich über das zweite Exon erstreckt (Abb.2.25,B,blau). Der OLR kodiert für ein 406 Aminosäuren großes putatives Protein. Die beiden P-Elemente sind 628bp (*wurst*^{G0162}) bzw. 641bp (*wurst*^{G0328}) vor dem OLR im ersten Exon inseriert.

denen UAS-CG9089 ubiquitär mit *aktin*-GAL4 oder *arm*-GAL4 exprimiert wird (siehe 4.6.4), lebensfähig sind, können Rettungsversuche an *wurst*^{G0162} Mutanten erfolgen (siehe 4.6.8). Die normalerweise letalen *wurst* mutanten Männchen überleben aufgrund der CG9089 Überexpression und können anhand des im P-Element vorhandenen „mini-white“ Gens über ihre rote Augenfarbe identifiziert werden (Abb.2.26,A). Die CG9089 mRNA wird spezifisch in ektodermalen Epithelien exprimiert (siehe 2.7.4). Eine CG9089 Überexpression in ektodermalen Epithelien mit dem 69B-GAL4 Treiber führt ebenfalls zur Lebensfähigkeit von *wurst*^{G0162} mutanten Männchen. Eine Rettung mit dem Tracheentreiber *btl*-GAL4 ist jedoch nicht möglich.

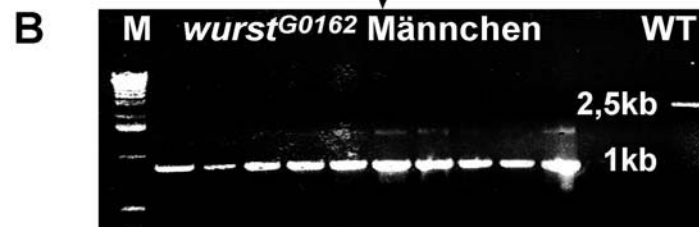
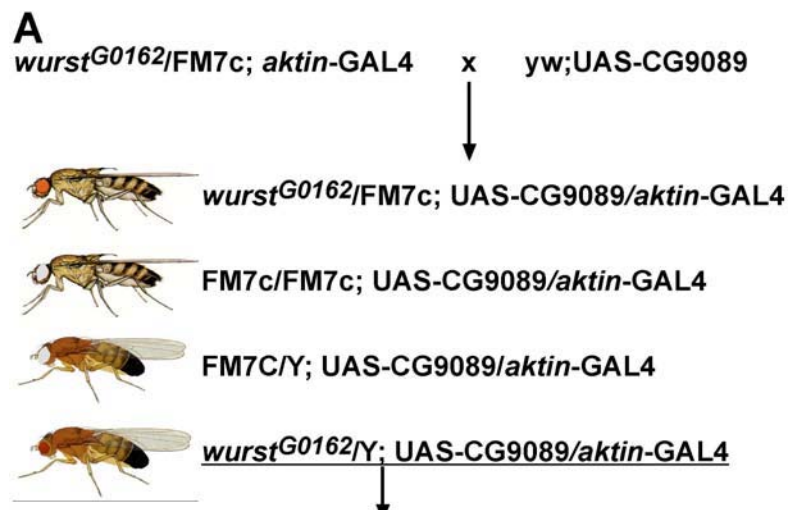
Durch eine Kreuzung der überlebenden mutanten Männchen mit heterozygoten *wurst* mutanten Weibchen (*wurst*^{G0162}/FM7c-Balancer-Chromosom) können auch überlebensfähige *wurst* homozygot mutante Weibchen (*wurst*^{G0162}/*wurst*^{G0162}) erzeugt werden, die durch ihre runde Augenform zu identifizieren sind. Die Erzeugung überlebensfähiger mutanter Weibchen mit Hilfe der *wurst* Überexpression bestätigt letztendlich auf genetischem Wege, dass das CG9089 Gen für die Letalität verantwortlich ist.

Mit Hilfe der PCR Analyse (siehe 4.5.16) wurde überprüft, ob bei *wurst* mutanten Männchen weiterhin das P-Element in *wurst* inseriert ist. Hierfür wurde genomische DNA aus einzelnen Fliegen isoliert. Zur Identifizierung des P-Elementes wurden Oligos ausgewählt, die entweder mit der DNA des P-Elementes oder mit der genomischen DNA hybridisieren. Ist das P-Element vorhanden, so werden etwa 1kb große PCR-Fragmente hergestellt. Ist das P-Element jedoch nicht vorhanden, so kommt es zur Herstellung von 2,5kb großen Fragmenten. Getestet wurden die mit *aktin*-GAL4 und mit 69B-GAL4 und UAS-CG9089 geretteten *wurst* mutanten Männchen. Als Kontrolle dienten WT Fliegen. Tatsächlich besitzen alle mit *aktin*-GAL4 und mit 69B-GAL4 geretteten Männchen etwa 1kb große PCR-Fragmente und somit das P-Element (Abb.2.26,B). Bei den WT Fliegen sind keine 1kb großen, sondern die erwarteten 2,5kb großen Fragmente vorhanden (Abb.2.26,B).

Die Rettungsexperimente zeigen, dass die *wurst*^{G0162} P-Insertion im Gen CG9089 für die Letalität verantwortlich ist und diese Letalität gezielt durch CG9089 Überexpression gerettet werden kann. Daher stellt CG9089 das *wurst* Gen dar. In den folgenden Abschnitten werden die UAS-CG9089 Konstrukte mit UAS-*wurst* bezeichnet.

Abb.2.26: CG9089 rettet die von *P-wurst^{G0162}* induzierte Letalität.

(A): Das in *wurst* inserierte P-Element G0162 wirkt sich letal auf hemizygot mutante Männchen aus. Um diese Letalität zu retten, wurden heterozygote *wurst^{G0162}* mutante Weibchen, die einen ubiquitären *aktin-GAL4* Treiber besitzen mit Männchen gekreuzt, die homozygot für UAS-CG9089 sind. In der Nachfolgegeneration überleben neben Tieren, die das FM7c Balancer-Chromosom tragen nun auch die *wurst^{G0162}* hemizygot mutanten Männchen. Die Letalität wird so mit Hilfe der ektopischen CG9089 Expression gerettet. Des



Weiteren ist auch eine Rettung mit 69B-GAL4, einem ektodermalen epithelialen Treiber, möglich. (B): Die geretteten *wurst* mutanten Männchen wurde mittels einer PCR Analyse auf das Vorhandensein des P-Elementes getestet. Zum Nachweis des P-Elements wurden Oligos verwendet, die im Anfangsbereich des P-Elements bzw. etwa 1kb aufwärts und 1,5kb abwärts der P-Insertion in CG9089 hybridisieren. Ist das P-Element in CG9089 inseriert, so entstehen etwa 1kb große PCR-Fragmente, wie sie bei den mit Hilfe von *aktin-GAL4* (Fragmente 1-5 vom Marker (M) aus) und 69B-GAL4 (Fragmente 6-10) geretteten Männchen zu sehen sind. In WT Fliegen, bei denen kein P-Element in CG9089 inseriert ist, entstehen die erwarteten 2,5kb großen PCR-Fragmente. Da eine Rettung der *wurst^{G0162}* induzierten Letalität mit CG9089 möglich ist, stellt CG9089 das *wurst* Gen dar.

2.7.3 Das *wurst^{G0162}* Reportergen ist in ektodermalen Geweben exprimiert

Das P-Element der Linie *wurst^{G0162}* besitzt ein aus E.coli stammendes *lacZ* Gen, das aufgrund der P-Insertion in das *wurst* Gen unter der Kontrolle von *wurst* Regulationselementen steht. Eine *lacZ* antisense-RNA *in situ* Studie und eine anti-β-GAL Antikörperfärbung führten daher zu ersten Erkenntnissen über die *wurst* Expression.

Offensichtlich ist die *lacZ* antisense-RNA in verschiedenen ektodermalen Epithelien exprimiert (Abb.2.27,A). Ein ähnliches Expressionsmuster besitzt das β-GAL Protein, das ab st14 in der Epidermis, dem Tracheensystem, im Vorderdarm und im Hinterdarm zu detektieren ist (Abb.2.27,B-D).

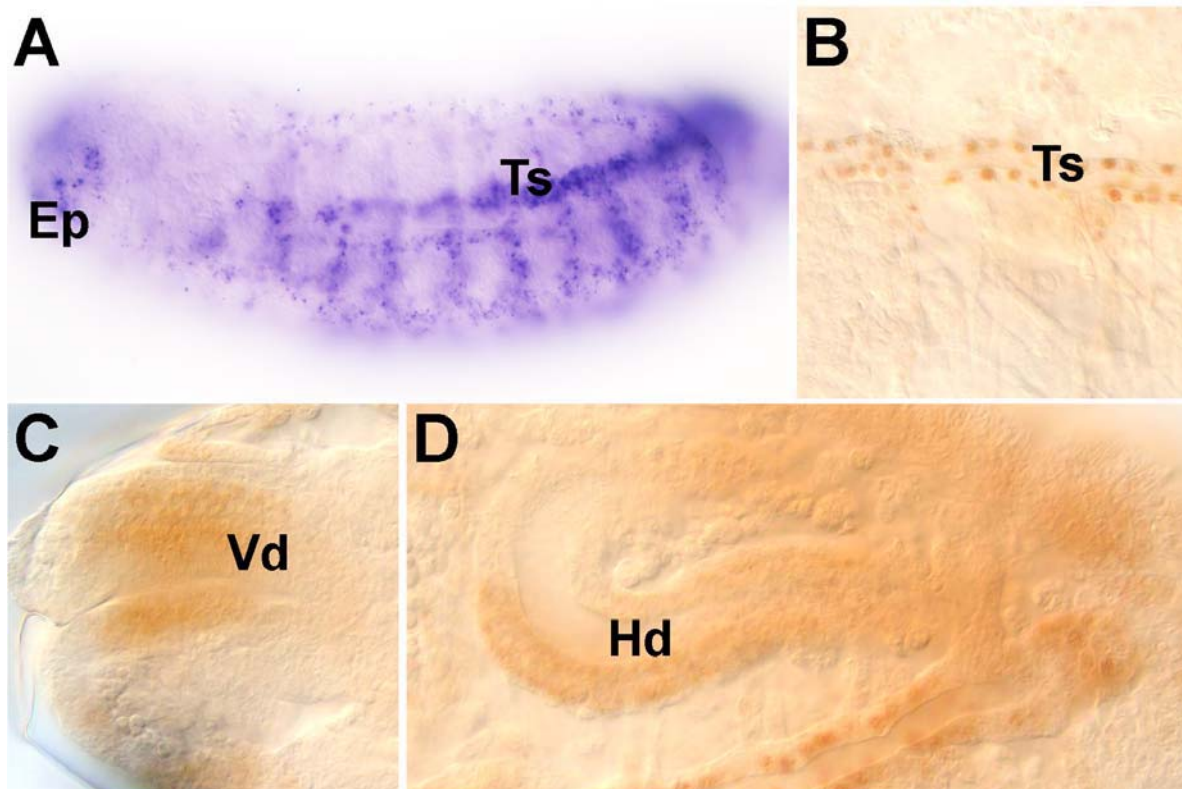


Abb.2.27: Die *wurst*^{G0162} Reporter Gen Expression. Zu sehen sind eine *lacZ* antisense-RNA *in situ* Studie (A) und anti-β-GAL Antikörperfärbungen (B-D) an st14 (A-C) und st16 (D) *wurst*^{G0162} Embryonen. Das *wurst*^{G0162} P-Element besitzt ein *lacZ*-Gen, das unter der Kontrolle von *wurst* Regulationselementen steht. **(A):** Die *lacZ* mRNA ist ab st 14 in ektodermalen Geweben zu beobachten. **(B-D):** β-GAL ist im Tracheensystem (B), dem Vorderdarm (C) und dem Hinterdarm (D) detektierbar. Epidermis (Ep), Hinterdarm (Hd), Tracheensystem (Ts), Vorderdarm (Vd).

2.7.4 Die *wurst* mRNA wird in ektodermalen Epithelien exprimiert

Das Gen CG9089 konnte als *wurst* identifiziert werden (siehe 2.7.2) Zur Analyse der embryonalen *wurst* Transkription wurden mit Hilfe der beiden EST cDNAs LD21986 und RE53344 Digoxigenin-markierte-antisense-RNA-Sonden hergestellt. Beide RNA-Sonden zeigen ein identisches Expressionsmuster, das in *wurst*^{G0162} mutanten Embryonen stark reduziert erscheint (siehe 2.8.1).

Das *wurst* Transkript ist im Embryo nur zygotisch verteilt. Erste gebildete mRNA ist während der späten embryonalen Entwicklung nach der Keimstreifenverkürzung ab st 14 zu beobachten (Abb.2.28,A,B). Die *wurst* Expression ist bis zum Ende der Embryogenese detektierbar und behält ihre Expressionsstärke bei (Abb.2.28,C,D). *wurst* wird im Vorderdarm (Abb.2.28,E), im Tracheensystem (Abb.2.28,F), im Hinterdarm (Abb.2.28,G) und in der Epidermis (Abb.2.28,G) exprimiert.

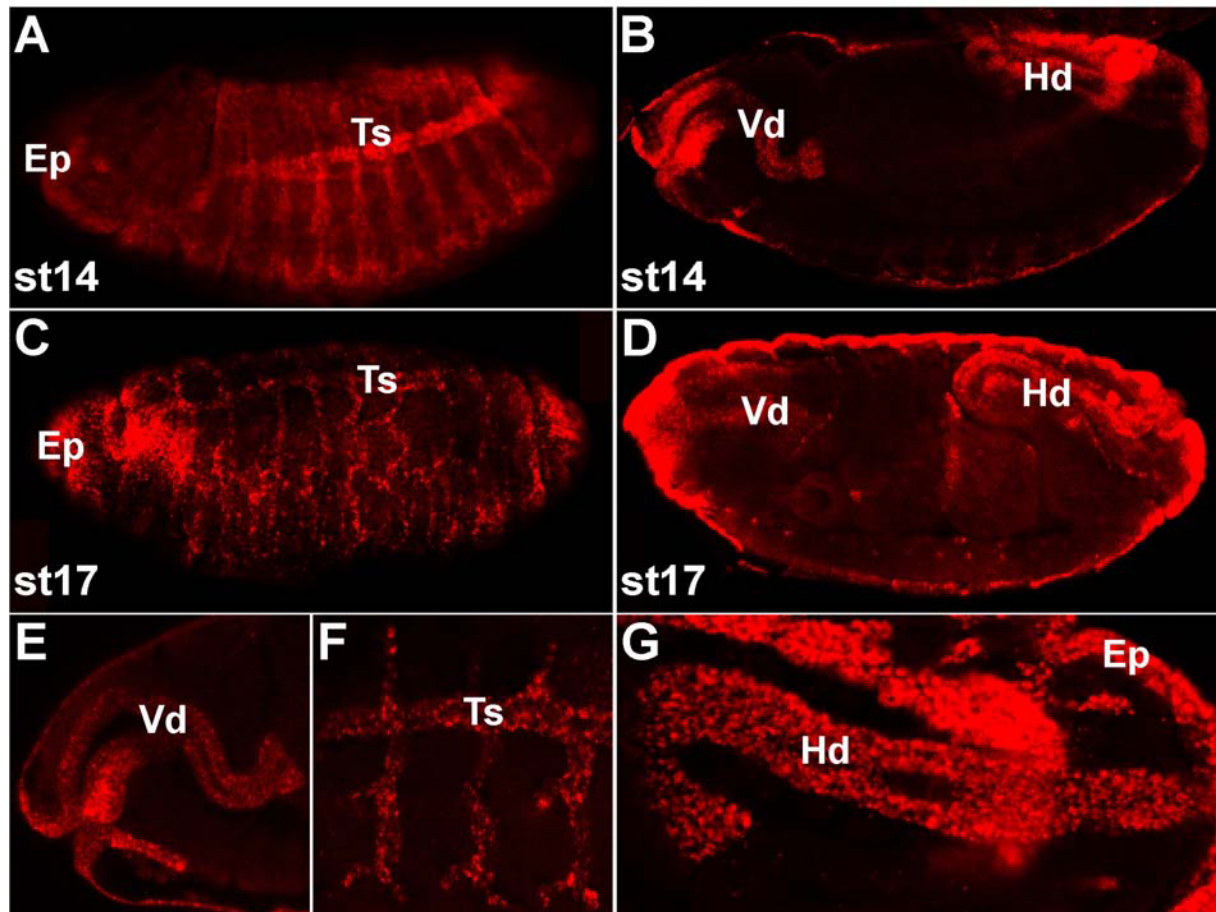


Abb.2.28: Embryonales *wurst* mRNA-Expressionsmuster. Gezeigt sind Fluoreszenz *wurst* antisense-RNA *in situ* Hybridisierungsstudien an Embryototalpräparaten. **(A,B):** Die *wurst* Expression beginnt nach der Keimstreifenverlängerung ab st14. **(C,D):** Das *wurst* Expressionsmuster verändert sich nicht und bleibt bis zum Ende der Embryogenese (st17) erhalten. **(E-F):** Teilausschnitte zeigen, dass *wurst* in Embryonen ab st14 (E,F) und im st17 (G) im Vorderdarm (E), dem Tracheensystem (F), dem Hinterdarm (G) und in der Epidermis (G) zu detektieren ist. Epidermis (Ep), Hinterdarm (Hd), Tracheensystem (Ts), Vorderdarm (Vd).

2.7.5 WURST ist ein Transmembranprotein mit einer DnaJ-Domäne

Ein Hydrophobizitäts-Blot ermittelte anhand der WURST Proteinsequenz sieben stark hydrophobe Regionen (Abb.2.29,A,blaue Linie). Dieselben sieben hydrophoben Bereiche erkennt auch DAS (Möller et al., 2001) als potentielle TM-Domänen (Abb.2.29,B). TMHMM2.0 (Möller et al., 2001) findet ebenfalls sieben TM-Domänen, wobei sechs mit einer sehr hohen und die siebte mit einer geringen Wahrscheinlichkeit berechnet werden (Abb.2.29,C). Die putativen TM-Domänen sind folgendermaßen angeordnet: TM-Domäne1= 50.-70.As; TM-Domäne2= 78.-98.As; TM-Domäne3= 132.-152.As; TM-Domäne4= 160.-180.As; TM-Domäne5= 187.-207.As; TM-Domäne6= 220.-240.As; TM-Domäne7= 250.-270.As. WURST besitzt von der 46.As bis zur 67.As ein Signal-Peptid (Abb.2.29,D), das mit Hilfe des Signal-IP Programms (Nielsen et al., 1997) berechnet wurde und ist somit ein potentiell sekretorisches Protein. Ob jedoch eine Prozessierung des Signal-Peptids und

damit des N-terminalen Bereichs inklusive der ersten TM-Domäne stattfindet bleibt ungeklärt. Weitere Strukturanalysen zeigen mit Hilfe von Net-Phos2 (siehe 4.5.19) am N-Terminus, in der Schleife zwischen der sechsten und siebten TM-Domäne, und am C-Terminus insgesamt 16 Protein-Kinase-C Konsensus Motive.

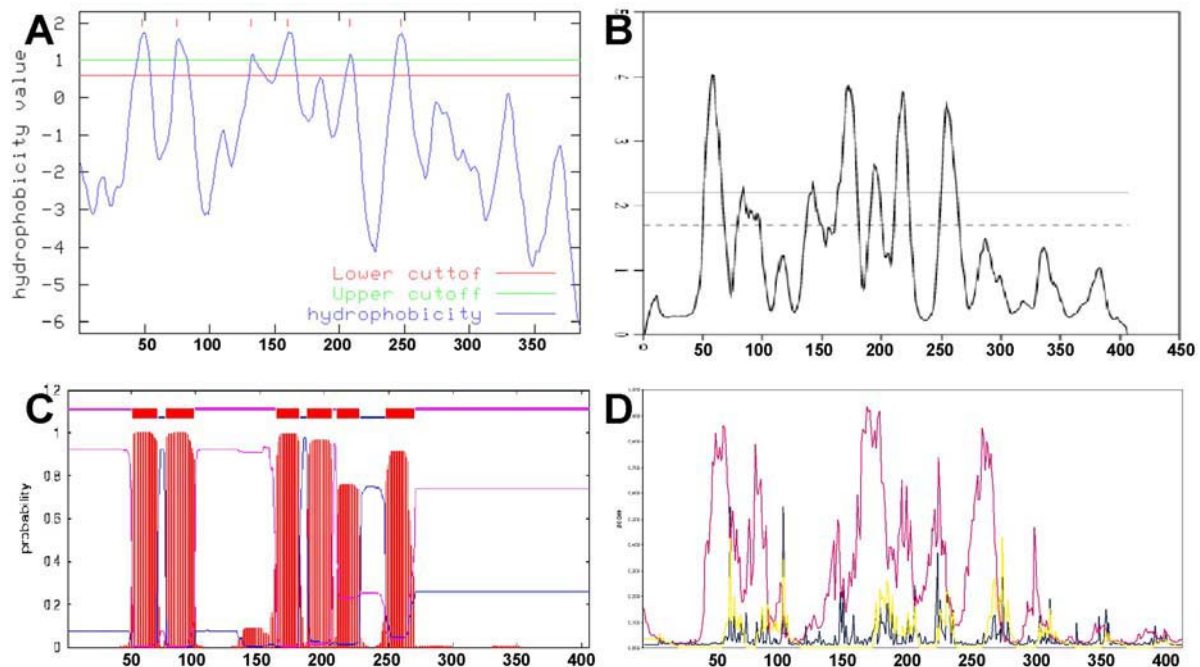


Abb.2.29: Strukturanalyse des putativen WURST Proteins. Mit Hilfe verschiedener Analyseprogramme wurden unterschiedliche Proteindomänen ermittelt. **(A-C):** Die 7 stark ansteigenden Werte (blaue Linie), die im [Hydrophobizitäts-Blot](#) (A) die untere Grenze (lower cutoff) erreichen oder überschreiten entsprechen den Regionen, die von DAS (B) als TM-Domänen ermittelt werden. TMHMM2.0 sagt mit einer hohen Wahrscheinlichkeit sechs und mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit eine siebte **TM-Domänen** voraus (C, rot schraffierter Bereich, roter Balken). **(D):** WURST besitzt ein **Signal-Peptid**, das sich von der 46. bis zur 67.As erstreckt (D, violette Linie).

Sequenzvergleiche von WURST mit Proteinen aus den Datenbanken der BDGP, NCBI und der SwissProt führten zur Identifizierung einer sogenannten DnaJ-Domäne, einer spezifischen Protein-Protein-Interaktionsdomäne. Diese DnaJ-Domäne erstreckt sich vermutlich von der 328. bis zur 384.As und besitzt eine Identität von 51% und eine Ähnlichkeit von 64% zur DnaJ-Domäne des *Drosophila* DnaJ-Protein-Homologs1 (DroJ1). Die DnaJ-Domänen zeichnen sich durch eine konservierte Sequenz und Struktur aus (Kelley, 1998). So besitzt das DroJ1 homologe humane HDJ1 Protein (Huntington's disease DnaJ1; Kazemi-Esfarjani und Benzer, 2000) eine DnaJ-Domäne, dessen Struktur der E.coli DnaJ-Domäne sehr ähnlich ist (Pellecchia et al., 1996; Kelley, 1998). Die DnaJ-Domänen von HDJ1 und E.coli Proteinen bestehen aus vier α -Helices und einem sogenannten HPD-Motiv, das immer zwischen der zweiten und der dritten Helix lokalisiert ist (Pellecchia et al., 1996). Die hohen Sequenzhomologien zur DnaJ-Domäne von DroJ1 und anderen DnaJ-

Domänen Proteinen und das typische HPD-Motiv (Abb.2.30,A,B) lassen auch bei der WURST-DnaJ-Domäne eine ähnliche Struktur vermuten.

2.7.6 WURST verwandte Proteine in Maus und Mensch

Die Suche in den Datenbanken der NCBI und der SwissProt zeigte, dass jeweils ein Protein aus Maus und Mensch eine signifikant hohe Sequenzähnlichkeit mit dem WURST Protein (FBgn0030805) besitzt. Diese Sequenzhomologien erstrecken sich über die gesamte WURST Proteinsequenz (Abb.2.30,A,B). Das Maus Protein (GC49298) besitzt 25% Identität und 40% Ähnlichkeit und das menschliche Protein (FLJ13236) 25% Identität und 43% Ähnlichkeit mit WURST.

Proteinsequenzanalysen deuten bei beiden putativen Proteinen auf eine WURST-ähnliche Struktur hin. So besitzen die Proteine sieben potentielle TM-Domänen und eine DnaJ-Domäne. Sequenzvergleiche zeigen bei den TM-Domänen und der DnaJ-Domäne die höchsten Ähnlichkeiten von WURST mit GC9298 und FLJ13236 (Abb.2.30,C), wobei ihre DnaJ-Domäne am C-terminalen Ende liegt, im Gegensatz zu den meisten bekannten DnaJ-Domänen Proteinen, die am N-Terminus zu finden sind.

Die Sequenz- und Strukturhomologien deuten daher auf eine Verwandtschaft der drei Proteine hin. Weder das Maus noch das Mensch Protein sind molekular analysiert. Beide Proteine sind nur aufgrund von Computeranalysen vorhergesagt. Weil es von dem Mausprotein eine EST cDNA (2810451A06) gibt, wird sein potentielles Gen offensichtlich auch transkribiert.



Abb.2.30: Sequenzvergleiche von WURST mit den homologen Proteinen aus Maus und Mensch. Für die Sequenzvergleiche sind die **TM-Domänen** rot, die **intrazellulären Bereiche** grün, die **extrazellulären Regionen** blau und die **DnaJ-Domänen** grau markiert. Ähnliche Aminosäuren sind mit „+“ gekennzeichnet. **(A):** Der Sequenzvergleich von WURST mit dem vorhergesagten Maus Protein GC49298 weist eine Identität von 25% (109/443 Aminosäuren) und eine Ähnlichkeit von 40% (176/443 Aminosäuren) auf. Das **HPD-Motiv** der DnaJ-Domäne ist in schwarz und fett markiert. **(B):** WURST besitzt eine Identität von 25% (109/429 Aminosäuren) und eine Homologie von 43% (185/429 Aminosäuren) zu dem vorhergesagten menschlichen Protein FLJ13236. **(C):** Der Vergleich einzelner Domänen zeigt die höchsten Ähnlichkeiten bei den TM-Domänen und der DnaJ-Domäne.

2.8 Charakterisierung der *wurst* Mutantenlinien

Die P-Insertionen von *wurst*^{G0162} und *wurst*^{G0328} bewirken embryonale Letalität (eigene Beobachtung, Peter et al., 2002). Im Gegensatz zu *wurst*^{G0328} führte die Remobilisierung des *wurst*^{G0162} P-Elements zur Erzeugung revertanter lebensfähiger Tiere (siehe 4.6.7). Interessanterweise zeigen „Southern-blot“ Analysen zur Bestimmung der Anzahl von P-Insertionen, dass bei *wurst*^{G0328} zwei P-Insertionen vorhanden sind, während bei *wurst*^{G0162} eine einzelne P-Insertion zu detektieren ist (persönliche Mitteilung Christian Wolf).

Weil offensichtlich nur *wurst*^{G0162} eine einzelne P-Insertion besitzt und diese für den letalen Phänotyp verantwortlich ist, wurden weitere Mutantenanalysen nur mit *wurst*^{G0162} durchgeführt.

2.8.1 In *wurst*^{G0162} mutanten Embryonen ist die *wurst* Expression reduziert

Die *wurst* mRNA wird in epithelialen Geweben exprimiert (Abb.2.31,A,B; siehe 2.7.4). Diese Expression ist in *wurst*^{G0162} mutanten Embryonen sehr stark reduziert (Abb.2.31,C,D). Da jedoch noch sehr geringe Mengen des *wurst* Transkripts in *wurst* mutanten Embryonen detektierbar sind und auch der mutante tracheale Phänotyp schwächer ausgeprägt ist, als der von *wurst*^{Df(1)D15} defizienten Embryonen (siehe 2.9.2), handelt es sich bei *wurst*^{G0162} sehr wahrscheinlich um ein hypomorphes Allel.

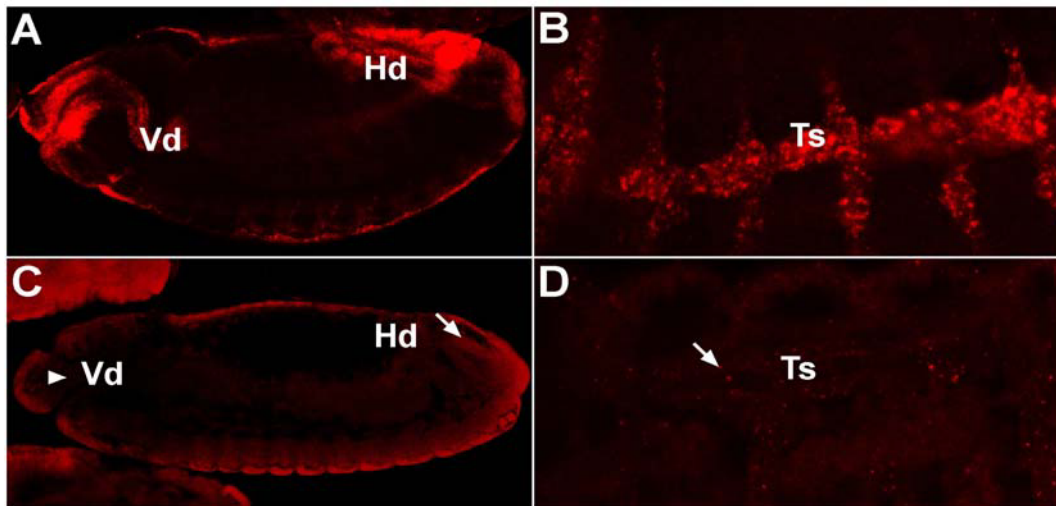


Abb.2.31: Die *wurst* Expression ist in *wurst*^{G0162} mutanten Embryonen stark reduziert. Fluoreszenz *wurst* antisense-RNA *in situ* Hybridisierungen an WT (A,B) und *wurst*^{G0162} mutanten (C,D) Embryonen im st14. **(A,B):** Im WT ist *wurst* in ektodermalen Geweben wie dem Vorder- und Hinterdarm (A) und im Tracheensystem (B) exprimiert. **(C,D):** In *wurst*^{G0162} mutanten Embryonen ist die *wurst* Expression nicht mehr zu detektieren (C, Pfeilspitze) oder wie im Hinterdarm (C, Pfeil) und im Tracheensystem (D, Pfeil) sehr stark reduziert. Hinterdarm (Hd), Tracheensystem (Ts), Vorderdarm (Vd).

2.9 Funktionelle Analysen von *wurst*

2.9.1 *wurst* beeinflusst die Tracheenmorphologie

Eine detailliertere Untersuchung des Tracheensystems mit Hilfe des Lumenmarkers 2A12 zeigt, dass der DH in st14 WT Embryonen ein Lumen mit einem annähernd gleichbleibenden Durchmesser besitzt (Abb.2.32,A). Dagegen sind in *wurst* mutanten Embryonen wechselnde Einschnürungen und Verdickungen im DH-Lumen zu erkennen (Abb.2.32,B). Hierbei sind die Verdickungen regelmäßig dort zu finden, wo dorsalen Äste auswachsen, während Einschnürungen im Bereich der transversalen Verbindungen entstehen. Der DH in *wurst* mutanten Embryonen wirkt daher wie eine Aneinanderreihung „wurst-ähnlicher“-Gebilde. Aufgrund dieses Phänotypus wurde das betroffene Gen als *wurst* bezeichnet. Dieser „Wurst-Phänotyp“ bleibt bis zum st15 erhalten (Abb.2.32,D).

Ab st16 erscheint das Tracheensystem von *wurst* mutanten Embryonen wellenförmig. Dies wird am DH aber auch an den transversale Verbindungen deutlich sichtbar (Abb.2.32,F). Außerdem besitzen *wurst* Embryomutanten zum Ende der Embryogenese im Kopfbereich einen stark deformierte DH (Abb.2.32,H). Das Tracheensystem ist in vergleichbaren WT Embryonen weder wellenförmig noch im Kopfbereich deformiert (Abb.2.32,E,G). Eine Markierung der Tracheenzellen mit Hilfe der 1-eve-1-Linie zeigt, dass in *wurst* Mutanten nicht nur das Lumen, sondern die kompletten Tracheenäste einschließlich ihrer Zellen einen wellenförmigen Verlauf nehmen und im st17 im Kopfbereich deformiert sind (Abb.2.32,J).

Sowohl der „Wurst-“ als auch der wellenförmige-Tracheenphänotyp weisen darauf hin, dass *wurst* an der Morphogenese trachealer Äste beteiligt ist.

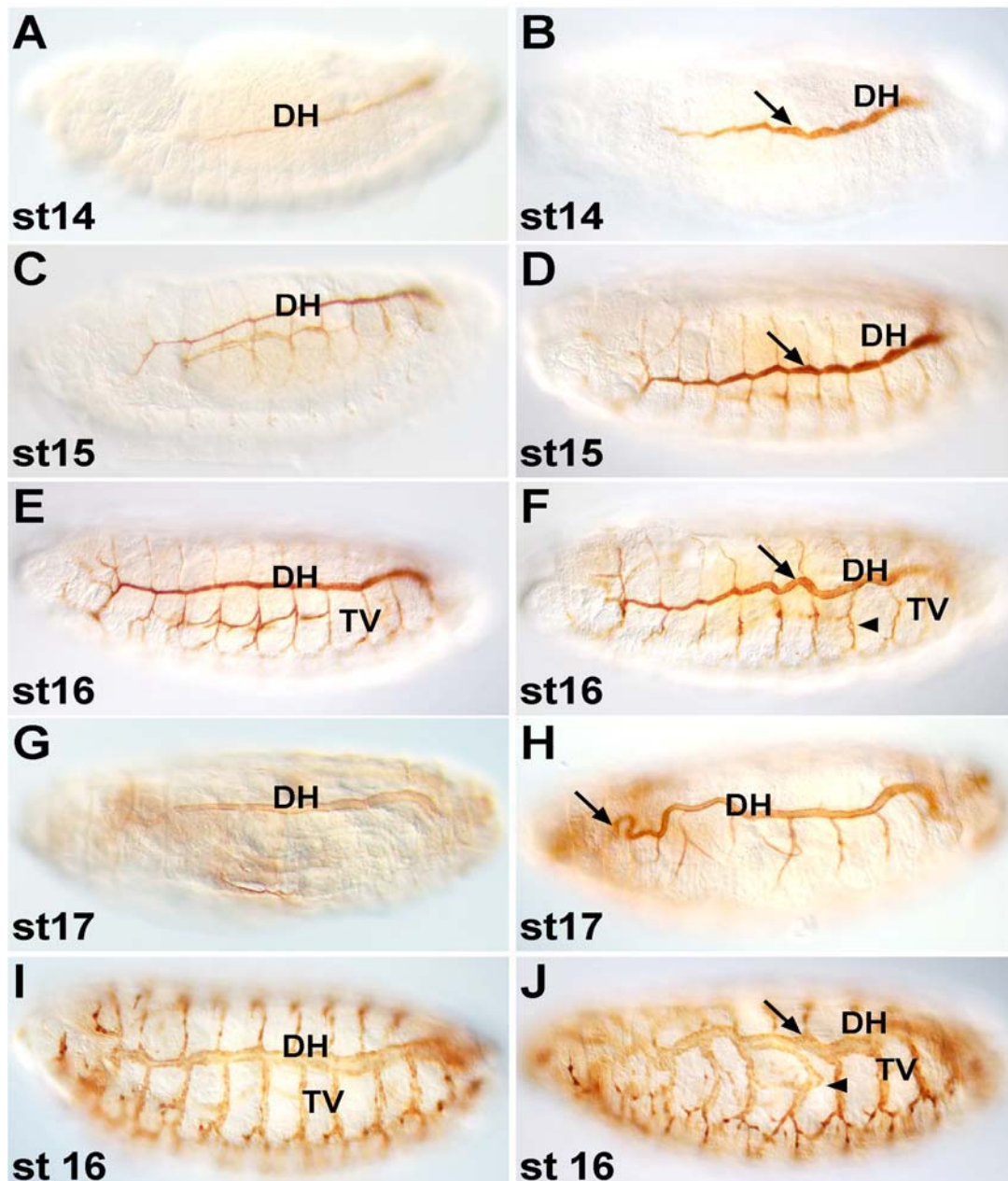


Abb.2.32: Entwicklung des Tracheensystems in WT und *wurst* mutanten Embryonen. Das Tracheensystem wurde an WT (linke Spalte) und *wurst*^{G0162} mutanten (rechte Spalte) Embryonen mit Hilfe des 2A12 Lumenantikörpers (A-H) und des Tracheenzellmarkers 1-eve-1 (I,J) sichtbar gemacht. **(A-D):** Während im WT von st14-15 (A,C) die dorsalen Hauptstämme relativ gerade auswachsen, sind in *wurst* Mutanten Lumen-Erweiterungen (B,D Pfeile) und Einschnürungen zu sehen. Ein DH erscheint daher wie eine Aneinanderreihung „wurst-ähnlicher“-Gebilde, die auch der Grund für die Namensgebung des *wurst* Gens sind. **(E,F):** WT Embryonen besitzen zum st16 relativ gerade ausgewachsene primäre Äste (E). Bei *wurst* Mutanten dagegen zeigen die primären Äste ungewöhnliche Beugungen, die am Besten im DH (F, Pfeil) und den transversalen Verbindungen (F, Pfeilkopf) zu sehen sind. **(G,H):** Der DH in *wurst* mutanten Embryonen ist zum st17, im Gegensatz zum WT (G), im Kopfbereich stark deformiert (H, Pfeil). Interessanterweise bleibt die 2A12 Expression in *wurst* Mutanten länger erhalten. **(I,J):** Der tracheale Beugungsphänotyp ist auch mit Hilfe des zellulären 1-eve-1 Markers an *wurst* Mutanten (J, DH=Pfeil und TV=Pfeilkopf) zu beobachten, während WT Embryonen gerade ausgewachsene Äste besitzen (I). dorsaler Hauptstamm (DH), transversale Verbindung (TV).

2.9.2 *wurst* ist an der Längenkontrolle der Tracheenäste beteiligt

Wie bei *mega*, so wurde auch bei *wurst* eine quantitative Analyse (siehe 2.4.2) zur Bestimmung der Länge trachealer Äste durchgeführt. *wurst*^{G0162} mutante Embryonen besitzen im Verhältnis zum WT (Abb.2.33,A) einen durchschnittlich um 11% längeren DH (n=22; Abb.2.33,B). *Df(1)D15* (*wurst*^{Df(1)D15}) *wurst* defiziente Embryonen (Abb.2.33,C) zeigen ebenfalls wellenförmige tracheale Äste, wobei Messungen einen um durchschnittlich 23% verlängerten DH (n=13) ergeben haben.

Weil die trachealen Phänotypen von *wurst* P-Mutanten und *wurst*^{Df(1)D15} defizienten Embryonen unterschiedlich stark ausgeprägt sind, handelt es sich bei *wurst*^{G0162} sehr wahrscheinlich um ein hypomorphes Allel (siehe 2.8.1).

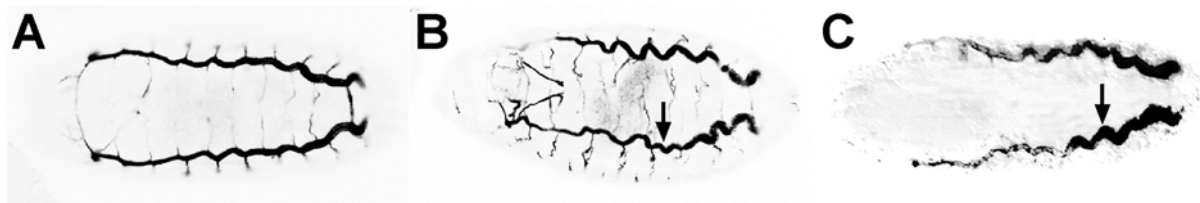


Abb.2.33: *wurst* mutante Embryonen besitzen verlängerte tracheale Äste. Dorsale Ansicht auf das Tracheensystem anhand von 2A12 Antikörperfärbungen an WT (A), *wurst*^{G0162} mutanten (B) und *wurst*^{Df(1)D15} defizienten (C) st16 Embryonen. **(A):** Im WT wächst ein DH relativ gerade von posterior nach anterior aus. **(B):** In *wurst*^{G0162} mutanten Embryonen ist der DH gebeugt und nimmt einen „zick-zack“-ähnlichen Verlauf (Pfeil) ein. Messungen zeigen, dass der DH in *wurst*^{G0162} Mutanten durchschnittlich um 11% länger ist als im WT. **(C):** In *wurst* defizienten Embryonen ist der DH (Pfeil) im Schnitt sogar um 23% länger als im WT.

2.9.3 *wurst* wirkt auf die tracheale Zellformgebung ein

Da *wurst* mutante Embryonen ein verlängertes Astwachstum besitzen wurde an *wurst*^{G0162} Mutanten die DH-Zellform untersucht. Konfokale Schnitte am DH zeigen ein verlängertes Zellwachstum (Abb.2.34,B). So besitzen die Zellen im Durchschnitt eine Länge von 6,0µm (Standardabweichung ±1,2µm, Anzahl der Zellen n=60) und eine Breite von 3,9µm (±0,8µm, n=60; Abb.2.34,C). Im WT besitzen die DH-Tracheenzellen dagegen eine kompaktere Form (Abb.2.34,A), sie sind durchschnittlich 4,7µm lang (±1,1µm, n=58) und 4,0 breit (±1,0µm, n=58; Abb.2.34,C).

Offensichtlich ist in *wurst* mutanten Embryonen die Tracheenzellform verändert, wobei von der Zellverlängerung nicht nur die apikale, sondern bei 43% der Zellen auch die laterale Membran betroffen ist (Abb.2.34,B). Dagegen ist in WT Embryonen nur bei 28% der DH-Zellen die laterale Zellseite länger als die apikale.

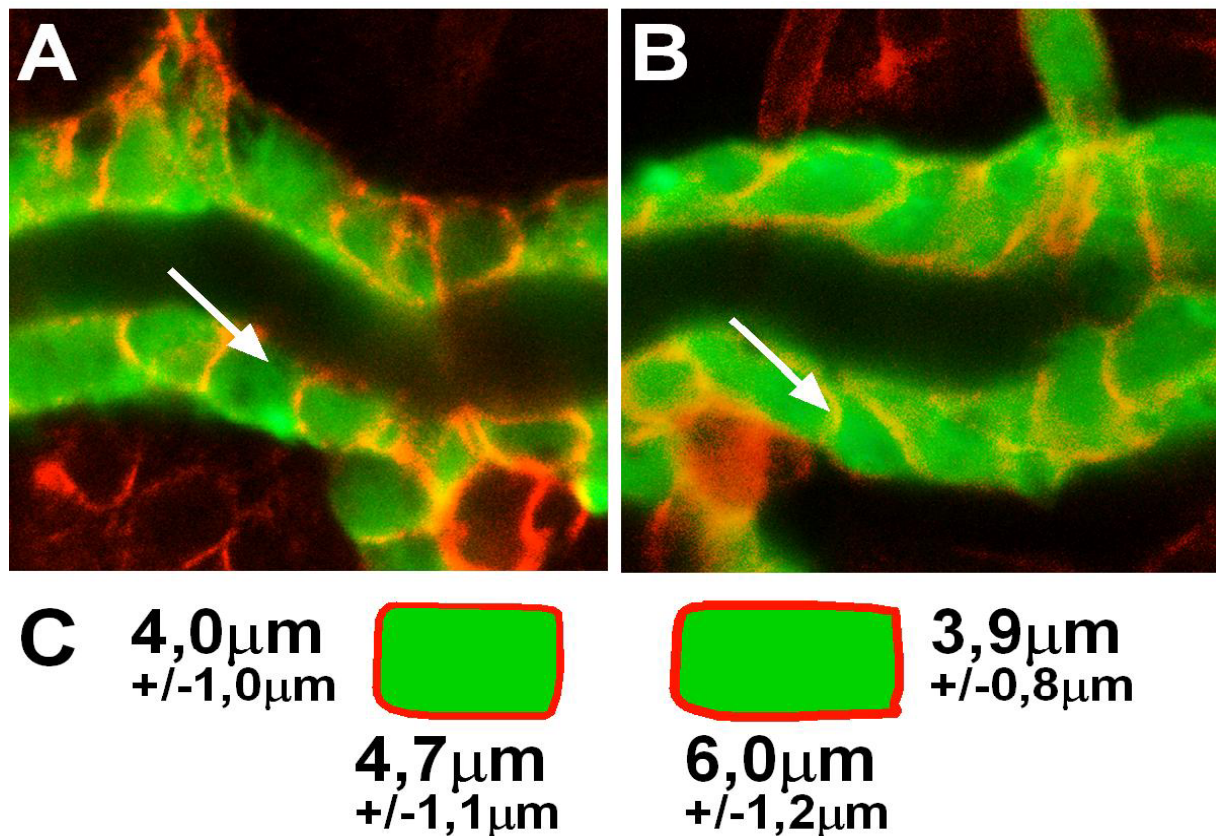


Abb.2.34: *wurst* ist an der Formgebung trachealer Zellen beteiligt. Mit Hilfe der *1eve1-lacZ*-Linie, des anti- β -Gal (grün) und des anti- α -SPECTRIN (rot) Antikörpers wurden Tracheenzellen und ihre Membran an st16 WT (A) und *wurst*^{G0162} mutanten (B) Embryonen durch konfokale Z-Achsenschnitte an DH-Zellen sichtbar gemacht. (A): Im WT erscheinen die DH-Zellen sehr kompakt (Pfeil). (B): In *wurst*^{G0162} besitzen die DH-Zellen gestreckte Zellformen. Ebenso ist zu sehen, dass auch die laterale Zellseite von der Zellstreckung betroffen ist (Pfeil). (C): Schematische Darstellung der durchschnittlichen DH-Zelle vom WT und der *wurst*^{G0162} Mutante. Messungen der Zellform von 58 DH-Zellen im WT und 60 DH-Zellen in *wurst*^{G0162} mutanten Embryonen verdeutlichen, dass sich Zellen in *wurst* mutanten Embryonen durchschnittlich um zusätzliche 1,3 μm strecken.

2.9.4 *wurst* ist an der Lokalisation des anti-2A12 Lumenantigens beteiligt

Ab st14, wenn die Fusion der dorsalen Hauptstämme vollzogen ist, detektiert der Antikörper 2A12 ein unbekanntes Antigen im Lumen des Tracheensystems (Abb.2.35,A). In *wurst*^{G0162} mutanten Embryonen ist das Antigen jedoch nicht nur im Tracheenlumen, sondern auch punktiert in den Tracheenzellen sichtbar (Abb.2.35,B,C). Um zu überprüfen, ob *wurst* an der Lokalisation des Antigens beteiligt ist, wurde *wurst* mit der UAS-*wurst* Linie und dem *btl*-GAL4 Treiber spezifisch im Tracheensystem überexprimiert. Auch die *wurst* Überexpression induziert eine punktierte 2A12 Lokalisation in den Tracheenzellen (Abb.2.35,D).

Die zellulären 2A12 Antikörperfärbungen in *wurst* mutanten und *wurst* überexprimierenden Embryonen deuten auf eine Beteiligung von *wurst* an der Lokalisation des Lumenantigens hin.

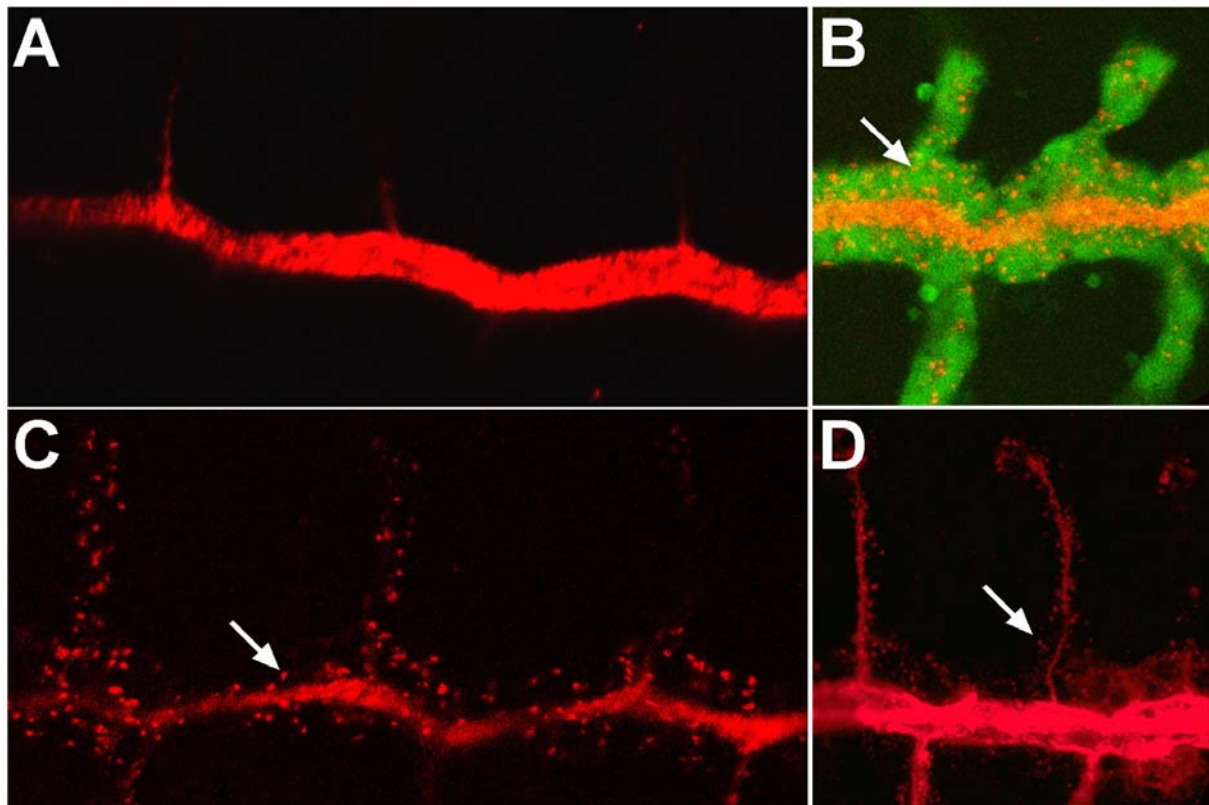


Abb.2.35: *wurst* ist an der Lokalisation des 2A12 Lumenantigens beteiligt. Gezeigt sind 2A12 (rot) und anti- β -GAL (grün) Fluoreszenzantikörperfärbungen am Tracheensystem von WT (A), *wurst*^{G0162} mutanten und *1eve1* tragenden (B), *wurst*^{G0162} mutanten (C) und *wurst* überexprimierenden (D; UAS-*wurst*/*btl*-GAL4) Embryonen zu Beginn st15. (A): Im WT ist das 2A12 markierte Antigen zum st15 ausschließlich im Lumen trachealer Äste detektierbar. (B;C): In *wurst*^{G0162} mutanten Embryonen ist 2A12 im Lumen und punktiert außerhalb des Lumens sichtbar (C, Pfeil). Das detektierte Antigen außerhalb des Lumens ist in den Tracheenzellen (grün) lokalisiert (B, Pfeil). (D): Eine spezifische Überexpression von *wurst* im Tracheensystem bewirkt ebenfalls eine Mislokalisierung des Antigens in den Tracheenzellen (Pfeil).

2.9.5 *wurst* ist für die Gasfüllung des trachealen Lumens essentiell

Das embryonale Tracheensystem ist mit Flüssigkeit gefüllt. Um seine Funktion als Transportsystem für Luft wahrnehmen zu können, wird das Tracheensystem etwa zwei Std. vor dem Schlüpfen der Larve belüftet (Abb.2.36,B; Manning und Krasnow, 1993). Wie der Prozess der Belüftung abläuft ist nicht bekannt.

Eigene Beobachtungen deuten darauf hin, dass durch die Umweltluft keine Belüftung des Tracheensystems erfolgt. Stattdessen bilden sich etwa 2Std. vor dem Schlüpfen der Larve in der Mitte des Tracheensystems Luftblasen aus, die sich schließlich vergrößern und vereinigen. Zum Ende der Embryogenese ist das Tracheensystem bei 24 der 25 WT Embryonen vollständig mit Gas gefüllt (Abb.2.36,B). Dagegen zeigen von den 25 *wurst*^{G0162} mutanten Embryonen lediglich 3 eine partielle und die übrigen 22 keine tracheale Gasfüllung (Abb.2.36,E). Um zu testen, ob *wurst* die Gasfüllung des Tracheensystems direkt

beeinflussen kann, wurden Rettungsversuche in *wurst*^{G0162} mutanten Embryonen mit Hilfe der UAS-*wurst* Linie und dem *btl*-GAL4 Treiber durchgeführt. Die Überexpression von *wurst* in *wurst*^{G0162} mutanten Embryonen führte bei 56% (40 von 72 Embryonen) zu einer partiellen Gasfüllung (Abb.2.36,F). Im Vergleich hierzu besitzen nur 19% der *wurst*^{G0162} mutanten Embryonen (6 von 31), die nur UAS-*wurst* aber keinen *btl*-GAL4 Treiber tragen, eine partielle tracheale Gasfüllung.

Der Gasfüllungsphänotyp in *wurst* Mutanten und die partielle Rettung durch eine gezielte *wurst* Überexpression im Tracheensystem demonstrieren, dass *wurst* an der embryonalen trachealen Gasfüllung beteiligt ist.

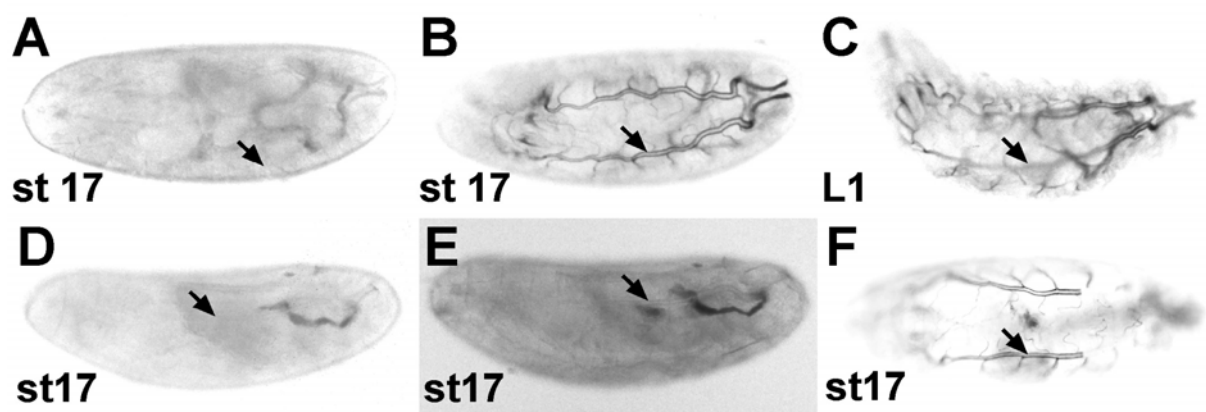


Abb.2.36: *wurst* ist essentiell für die Gasfüllung des embryonalen Tracheensystems. Eine Analyse zur trachealen Gasfüllung an lebenden WT Tieren (A-C), *wurst*^{G0162} Mutanten (D,E) und *wurst*^{G0162} Mutanten, die UAS-*wurst* und *btl*-GAL4 besitzen (F). **(A-C):** Ein WT Embryo besitzt drei Std. vor dem Schlüpfen ein mit Flüssigkeit gefülltes Tracheensystem, das lichtmikroskopisch kaum sichtbar ist (A, Pfeil). Etwa 2 Std. später wird das Tracheensystem des Embryos vollständig mit Gas belüftet (B, Pfeil). Eine weitere Std. später schlüpft die Larve, die das Tracheensystem (C Pfeil) nun zum Gastransport nutzt. **(D,E):** Der *wurst*^{G0162} mutante Embryo besitzt, wie der gleichaltrige WT Embryo, zum Ende st17 ein mit Flüssigkeit gefülltes Tracheensystem (D, Pfeil). Im Gegensatz zum WT füllt sich das Tracheensystem der *wurst*^{G0162} Mutante jedoch nicht mit Gas (E, Pfeil). Trotz mehrstündigen Nachalterns bis zum Tod des Embryos findet keine Belüftung des Tracheensystems statt. Ebenso wenig ist ein Schlüpfen des Embryos zu beobachten. **(F):** Wird *wurst* mit Hilfe des UAS-GAL4 Systems spezifisch im Tracheensystem von *wurst*^{G0162} mutanten Embryonen überexprimiert, so findet bei 56% der mutanten Embryonen eine partielle tracheale Gasfüllung statt (F, Pfeil). Interessanterweise ist der posteriore Bereich des Embryos nicht mit Gas gefüllt, was eine Belüftung über die bei Larven nach außen geöffneten posterioren Spirakel ausschließt. Trotz der Überexpression von *wurst* im Tracheensystem und der partiellen Gasfüllung schlüpft der Embryo nicht.

3 Diskussion

Das Tracheensystem von *Drosophila* ist ein einschichtiges epitheliales Röhrensystem. Es wird von polarisierten Zellen gebildet, deren apikale Seiten nach innen zum Lumen zeigen. Die Aufgabe des Tracheensystems ist der Gastransport zwischen der Umwelt und den trachealen Zielgeweben (Affolter und Shilo, 2000; Lubarsky und Krasnow, 2003). Um die Zielgewebe in den unterschiedlichen Bereichen des Körpers zu erreichen, wachsen die Äste des Tracheensystems auf definierte Längen aus. Außerdem bilden die verschiedenen Äste charakteristische Lumendurchmesser aus, damit eine ausreichende Gasdiffusion gewährleistet wird. Aufgrund der stereotypen Anordnung des Tracheensystems war zu erwarten, dass Länge und Durchmesser trachealer Äste einer strikten genetischen Kontrolle unterliegen. Um Gene identifizieren zu können, die an der Astkontrolle beteiligt sind, habe ich mutante Embryonen einer P-Element-Kollektion (Peter et al., 2002) auf morphologische tracheale Veränderungen untersucht. Tatsächlich besaßen die Embryonen einiger P-Linien mutante Tracheenphänotypen, die ein verändertes Längenwachstum der Äste andeuteten. Die P-Elemente dieser Linien sind zum einen in das bekannte Gen *dlg*, dessen Genprodukt in SJs epithelialer Zellen lokalisiertes ist, und zum anderen in zwei noch unbekannte Gene inseriert. Eines der beiden unbekannten Gene ist *mega*, dessen Genprodukt ebenfalls eine integrale SJ Komponente darstellt. Sowohl die MEGA Proteinstruktur als auch seine Funktion sind mit den aus Vertebraten bekannten Claudinen verwandt. Das zweite unbekannte Gen wurde aufgrund seines trachealen Phänotyps als *wurst* bezeichnet. WURST ist ein putatives Transmembranprotein, das zur Familie der DnaJ-Domänen Proteine gehört. Beide Gene, sowohl *mega* als auch *wurst* sind im Tracheensystem und anderen ektodermalen Geweben exprimiert.

3.1 MEGA ist ein essentielles ektodermales Transmembranprotein

Mutante Embryonen der P-Linien G0012 und G0044 besitzen einen stark wellenförmigen trachealen Phänotyp (siehe 2.4.1). Dieser Phänotyp ist dem von Beitel und Krasnow (2000) beschriebenen Phänotyp mutanter Embryonen der EMS induzierten Mutantenlinien *mega*^{EA97} und *mega*^{VE896} sehr ähnlich (siehe 2.4.2). Weil beide P-Linien in 2A4 auf dem X-Chromosom inseriert sind und die EMS induzierten Mutationen sich in derselben Region befinden, wurden mit den beiden P- und den EMS-Linien Komplementationsanalysen durchgeführt. Tatsächlich bilden die P-Linien G0012 und G0044 eine Komplementationsgruppe mit den *mega* EMS-Linien. Dadurch wird gezeigt, dass es sich bei den P-Linien um zwei neue *mega* Allele handelt. Da die Transkriptionseinheit von *mega* unbekannt war, wurde sie anhand der

P-Insertionsstellen identifiziert. Beide P-Elemente sind in das zweite Exon einer Transkriptionseinheit inseriert, die aus 5 Exons und 4 Introns besteht. Ihr OLR erstreckt sich vom zweiten bis zum fünften Exon und kodiert für ein kleines putatives Protein mit einer Größe von 256 Aminosäuren. Interessanterweise führt im OLR der EMS Mutantenlinien jeweils ein Nukleotidaustausch zur Veränderung der Proteinsequenz, die wiederum die Funktion des MEGA Proteins stark beeinträchtigt. Der Komplementationstest und die identifizierten Mutationen zeigen, dass es sich bei der Transkriptionseinheit um *mega* handelt. Diese Aussage wird durch den Verlust der *mega* Expression in mutanten Embryonen beider P-Linien und durch die MEGA Mislokalisierung in *mega*^{VE896} Embryomutanten bekräftigt.

Die *mega* mRNA und das MEGA Protein besitzen ein identisches Expressionsmuster (vgl. 2.2.5 mit 2.2.6). Beide sind maternal ubiquitär bis in das zelluläre Blastodermstadium 5 exprimiert. Die maternale MEGA Komponente ist jedoch nicht lebensnotwendig. Zygotisch gebildetes MEGA wird in ektodermalen Epithelien exprimiert. Die beobachteten Phänotypen im Tracheensystem, der Epidermis, den Speicheldrüsen und dem Hinterdarm von *mega* mutanten Embryonen korrelieren mit dem MEGA Expressionsmuster.

Die Mutationen der vier Mutantenlinien betreffen *mega* in unterschiedlicher Ausprägung (siehe 2.3). Am stärksten wirken sich die P-Insertionen auf *mega* aus, da weder *mega* mRNA- noch Proteinexpression in *mega* P-mutanten Embryonen zu detektieren ist. Bei den P-Linien handelt es sich um *mega* Nullmutanten. Die P-mutanten Tiere sterben bereits zum Ende der Embryogenese. In *mega*^{VE896} Embryomutanten dagegen wird die *mega* mRNA und das MEGA Protein normal in ektodermalen Geweben exprimiert. Die EMS induzierte Mutation bewirkt einen As-Austausch im Anfangsbereich der zweiten TM-Domäne, so dass das TM-Protein MEGA in *mega*^{VE96} Mutanten ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert ist. Mutante *mega*^{VE96} Embryonen besitzen ähnlich starke Phänotypen, wie die P-Mutanten und sind ebenfalls embryonal letal. Weil MEGA^{VE896} nicht in die Zellmembran eingebunden wird, verliert es offensichtlich seine vollständige Funktion. Die *mega*^{EA97} Mutation verursacht weniger stark ausgeprägte Phänotypen. *mega*^{EA97} mRNA und Protein sind im Vergleich zum WT unverändert exprimiert und lokalisiert. MEGA^{EA97} besitzt einen As-Austausch in der N-terminalen extrazellulären Schleife, die für die MEGA Funktion sehr wichtig zu sein scheint. Trotz normaler MEGA^{EA97} Lokalisation sterben 63% der mutanten Tiere bereits zum Ende der Embryogenese und die restlichen 37% spätestens während der Larvenentwicklung. Interessanterweise ist die Anzahl der schlüpfenden *mega*^{EA97} mutanten Larven (37%) ähnlich hoch, wie die Anzahl *mega*^{EA97} mutanter Embryonen, die eine funktionierende transepitheliale Barriere (35%) besitzen. Der Verlust der transepithelialen Barriere ist daher möglicherweise der Grund für die Letalität *mega* mutanter Tiere. Die Ursache für den frühen Zeitpunkt ihrer Sterblichkeit bleibt jedoch offen, da das Tracheensystem, das Darmsystem

und die Speicheldrüsen erst zu Beginn der Larvenentwicklung ihre Funktionen wahrnehmen. Da zudem keine Defekte in der Epidermis detektiert wurden, könnte der Verlust der epithelialen Nervenzellbarriere ein Grund der frühen Letalität sein.

Interessanterweise führen auch ubiquitäre oder gezielte ektodermale MEGA Überexpressionen zum Tod der Tiere, da das Schlüpfen eines Imagos nicht beobachtet wurde. Vermutlich ist auch die Menge des MEGA Proteins entscheidend für eine normale Zellfunktion.

3.2 MEGA ist ein Septate Junction assoziiertes Protein

Kolokalisationsstudien mit verschiedenen Markern der lateralen Membran epithelialer Zellen haben gezeigt, dass MEGA in den SJs lokalisiert ist. Zudem ist MEGA nur in ektodermalen Epithelien exprimiert, die ausschließlich gefaltete SJs besitzen (siehe 2.2.6; siehe 2.2.7).

SJs sind Komplexe, die im Embryo ab st14 an der apikolateralen Zellmembran polarisierter, epithelialer Zellverbände elektronenmikroskopisch sichtbar werden (Tepass und Hartenstein, 1994). Von den SJ sind nur wenige Komponenten bekannt, die jedoch unterschiedliche Funktionen einnehmen. So bilden DLG und SCRIB einen Komplex (siehe 1.2.1), der schon zur frühen Embryonalentwicklung an der Ausbildung der Zellpolarität und später, wenn die SJs morphologisch erkennbar sind, an der lateralen Membranorganisation beteiligt ist (Bilder et al., 2003). Des Weiteren besitzen beide Proteine Tumorsuppressor Funktion in den Imaginalscheiben (Bilder und Perrimon, 2000). Eine der Hauptfunktionen der SJs ist jedoch der Aufbau einer transepithelialen Barriere mit Hilfe des Proteinkomplexes NRX und COR. Die transepitheliale Barriere vermittelt die Kontrolle des parazellulären Transportes entlang der Epithelien (Baumgartner et al., 1996; Lamb et al., 1998; Ward et al., 2001). Bedingt durch den direkten Zell-Zellkontakt und der Festigkeit von SJ Strukturen wird vermutet, dass SJs auch an der Zelladhäsion (Tepass et al., 2001) und der Zellformgebung (Baumgartner et al., 1996) beteiligt sind. MEGA, das im Embryo etwa eine Std. vor der Morphogenese der SJs in primären Epithelien exprimiert wird, scheint für die SJ Funktionen eine Rolle zu spielen.

Im Gegensatz zu *dlg* oder *scrib* ist in *mega* mutanten Embryonen keine Veränderung der apikalen Zellpolarität zu beobachten. Typische apikolaterale Polaritätsmarker sind zu keinem Zeitpunkt in *mega* mutanten Embryonen mislokalisiert (siehe 2.4.5). MEGA scheint daher weder an der Herstellung noch am Erhalt der apikalen Zellpolarität beteiligt zu sein. Anders verhält es sich jedoch mit den SJs Komponenten COR, NRX und FAS3, die in *mega* mutanten Embryonen mislokalisiert sind (siehe 2.4.7). Es kann daher angenommen werden,

dass die beobachtete Mislokalisierung der SJ Proteine in *mega* Mutanten durch die Zerstörung der pSJ Struktur hervorgerufen wird (siehe 2.4.7).

MEGA ist offensichtlich an der Zellformgebung beteiligt, da mutante Tracheenzellen gestreckte und dünnere Formen annehmen (siehe 2.4.3). Meistens ist die Seite, die parallel zum Tracheenlumen liegt, von der Zellstreckung betroffen. Diese Verlängerung der apikalen Zellseite könnte schließlich zu längeren Tracheenästen bzw. zu dem beobachteten wellenförmigen *mega* mutanten Tracheenphänotyp führen. Bisher wurde lediglich vermutet, dass die SJs möglicherweise die Zellform beeinflussen können, da in *nrx* mutanten Embryonen abgerundete Zellen der Chordotonalorgane und eine fehlende dorsale Schließung beobachtet wurde (Baumgartner et al., 1996). Meine Analysen an Tracheenzellen von *mega* mutanten Embryonen zeigen eindeutig eine Beteiligung der SJs an der Zellformgebung (siehe 2.4.3).

Unklar bleibt allerdings über welche zellulären Mechanismen die SJs Einfluss auf die Zellform nehmen. Ein Einwirken von MEGA auf das Zytoskelett oder auf die Zelladhäsion könnte z.B. eine Veränderung der apikalen Zelllänge bewirken. Die apikale Anreicherung des Aktin- und Tubulinzytoskeletts aber auch die Mikrotubuliorientierung scheinen in *mega* Embryomutanten nicht betroffen zu sein (siehe 2.4.4). MEGA besitzt jedoch am C-terminalen Ende ein PDZ-Binde-Motiv. Aufgrund dieses PDZ-Binde-Motivs ist es denkbar, dass PDZ-Domänen-Proteine, wie z.B. MAGUK-Proteine, an MEGA binden und so eine Vernetzung mit Zytoskelettkomponenten bewirken. Eine Suche nach potentiellen Interaktionspartnern, z.B. über einen Hefeinteraktionstest könnte gezeigt werden, ob MEGA direkt oder indirekt mit dem Zytoskelett verknüpft ist.

Als Konsequenz aus den Zellformveränderungen stellte sich die Frage, ob MEGA Einfluss auf die Zelladhäsion nehmen kann. Zelladhäsionsdefekte wie sie bei mutanten Embryonen von ZA Komponenten wie dem *Drosophila* E-CADHERIN (Uemura et al., 1996) und ARM (Cox et al., 1996) vorkommen, sind bei MEGA Mutanten nicht zu beobachten. Dies ist allerdings auch zu erwarten, weil MEGA weder die Polarität noch die Ausbildung der AJs oder der späteren ZA beeinflusst (siehe 2.4.5). Trotzdem sprechen mehrere Punkte für eine Beteiligung des MEGA Proteins an der Zelladhäsion: zum Ersten erscheinen die DH-Zellformen ohne Einflussnahme des Zytoskeletts verändert (siehe 2.4.4); zum Zweiten ist die Struktur der pSJs, die ganz offensichtlich Funktionen bei der Zelladhäsion besitzen (Tepass et al., 2001), zerstört (siehe 2.4.7); zum Dritten ist das an der Zelladhäsion beteiligte Protein FAS3 (Snow et al., 1989) an der lateralen Membran mislokalisiert und kann deshalb seine natürliche Funktion möglicherweise nicht mehr aufnehmen. MEGA scheint daher über direkte oder indirekte Weise in die Zelladhäsion einzugreifen und über diese möglicherweise

die tracheale Zellform zu verändern, um so schließlich die Länge der Tracheenäste zu kontrollieren.

Die Hauptaufgabe der SJs ist die Bildung einer transepithelialen Barriere. Von keiner anderen Membranregion ist bisher eine Beteiligung an der Barrierefunktion bekannt (Tepass et al., 2001). Die Funktion der Barriere kann mittels Dextran Injektionsexperimenten analysiert werden (Lamb et al., 1998). 10kDa großer Dextranfarbstoff kann in WT Embryonen die transepitheliale Barriere nicht passieren. In *mega* Nullmutanten gelangt der Dextranfarbstoff dagegen innerhalb weniger Minuten ungehindert über parazelluläre Wege durch die Epithelien in das Lumen von Speicheldrüsen und Tracheensystem (siehe 2.4.6). Ein ähnlicher Phänotyp ist in *mega*^{VE896} mutanten Embryonen zu beobachten in denen MEGA^{VE896} nicht mehr membranassoziiert ist. Ebenso zeigen Überexpressionsstudien, dass zuviel MEGA und mislokalisiertes MEGA die Barrierefunktion verändern (Daten nicht gezeigt). MEGA muss also zum Aufbau und/oder Erhalt der transepithelialen Barriere nicht nur mit der Membran, sondern auch in einer bestimmten Menge mit den SJs assoziiert sein. Wie ist MEGA am Aufbau und/oder Erhalt der transepithelialen Barriere beteiligt? In hypomorphen *mega*^{EA97} mutanten Embryonen ist MEGA^{EA97} ganz normal in den SJ lokalisiert. Trotzdem führt ein einzelner As-Austausch in der N-terminalen großen extrazellulären Schleife bei ca. 65% der Embryomutanten zum Verlust der Barrierefunktion. Offensichtlich ist die extrazelluläre Domäne für die Barrierefunktion essentiell. Möglicherweise interagiert die extrazelluläre Schleife von MEGA mit integralen SJ Proteinen der Membran benachbarter Zellen und ist so grundlegend am Aufbau der SJs und der extrazellulären Barriere beteiligt. Schließlich ist wenig über die Selektivität transepithelialer Barrieren im Embryo bekannt. Wie wird sie kontrolliert? Injektionsexperimente mit kleineren und größeren Dextranfarbstoffen (3kDa, 40kDa und 70kDa) in Mehrfachmutanten von *mega*, *cor* und *nrx* könnten weitere Aufschlüsse über die Funktion der Barriere liefern.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass in WT Embryonen die Septa der pSJs zwischen den Membranen epithelialer Zellen eine leiterförmigen Struktur einnehmen (siehe 1.2; Tepass und Hartenstein, 1994). In *mega*^{G0012} mutanten Embryonen ist dagegen diese leiterförmige Struktur nicht mehr zu beobachten. Stattdessen scheint sich der extrazelluläre Zwischenraum mit elektronendichtem Material zu füllen (siehe 2.4.7). Diese Füllung besteht möglicherweise aus extrazellulären Proteinen, die mit den pSJs assoziiert sind und beim Verlust der Septa unkoordiniert abgelagert werden. Aber auch integrale membranständige SJ Komponenten wie COR, NRX und FAS3 scheinen beim Verlust der Septa-Struktur ihre natürliche Ordnung zu verlieren und sind an der basolateralen Membran mislokalisiert (siehe 2.4.7). MEGA scheint daher für die Morphogenese der leiterförmigen Septa-Struktur essentiell zu sein. Die zellmembranübergreifenden Septa bilden parazelluläre Wege, die je länger sie sind, verschieden große Moleküle herausfiltern (Aschenbrenner und Walz, 1998).

Daher ist die Zerstörung der Septa-Struktur sehr wahrscheinlich der Grund für den beobachteten Barrierephänotyp in *mega* mutanten Embryonen. Vergleichbare Beobachtung an *cor* und *nrx* mutanten Embryonen bekräftigen diese Vermutung. Auch bei ihnen ist die Septa-Struktur und gleichzeitig die transepitheliale Barriere betroffen (Baumgartner et al., 1996; Lamb et al., 1998). Interessant wäre daher zu beobachten, ob in *mega*^{EA97} mutanten Embryonen, bei denen die extrazelluläre Schleife mutiert ist, die Septa-Struktur völlig zerstört ist oder in einer weniger konzentrierten Anreihung vorliegt, da noch etwa 35% der Mutanten eine funktionelle Barriere besitzen. Neben der Barrierefunktion vermitteln die Septa über ihren direkten Kontakt zu SJs der Nachbarzellen auch Zelladhäsion (Tepass et al., 2001). Aufgrund des Verlustes der pSJ Strukturen ist es daher auch sehr wahrscheinlich, dass in *mega* Mutanten die Zelladhäsion verändert wird.

3.3 MEGA kontrolliert die Morphologie tubulärer Strukturen

Die Kontrolle von Länge und Durchmesser tubulärer Strukturen unterliegt definierten genetischen Prozessen. Beitel und Krasnow (2000) zeigen, dass im Embryo die apikale dem Lumen zugewandte Zellseite, zwischen st14 und st16 dynamischen Veränderungen unterliegt und sich in Richtung basaler Zellseite bewegt. Am Ende der Embryogenese hat sich der Lumendurchmesser vor allem in den dorsalen Hauptstämmen drastisch vergrößert, ohne dass sich dabei die basale, ins Embryoinnere gerichtete Zellseite, ausdehnt. Die Autoren schlossen hieraus, dass vermutlich nur die apikale Zellseite Länge und Durchmesser trachealer Äste kontrolliert. Weil die Lumenerweiterung erst ab st14 beginnt und das Auswachsen primärer Äste bis ins st15 hineinreicht, sind mutante tracheale Phänotypen, die eine Veränderung des Lumens und der Astlängen aufweisen, nicht vor st14 bzw. st15 erkennbar. So konnten Beitel und Krasnow keine Veränderung von Lumen oder Astlängen vor st14 in Embryomutanten identifizieren. Ebenso kann das verlängerte Astwachstum in *grh* mutanten Embryonen erst ab st15 beobachtet werden. *grh* ist an der Kontrolle der apikalen Zellmembran beteiligt (Hemphälä et al., 2002). In *grh* Mutanten ist ausschließlich die apikale Zellseite drastisch verlängert, was wiederum die Länge der tubulären Tracheenäste zu vergrößern scheint. Interessanterweise wurden in *grh* mutanten Embryonen jedoch nur Veränderungen der Astlängen aber nicht der Lumengrößen beobachtet. Entgegen der Annahme von Beitel und Krasnow gibt es seit Kurzem auch Hinweise, dass die laterale Zellmembran am Längenwachstum beteiligt ist. So sind in mutanten Embryonen von *fas2*, das für ein Zelladhäsionsmolekül kodiert, und *nirvana*, das eine Na²⁺/K⁺-transportierende ATPase α -Untereinheit kodiert, *mega* ähnliche wellenförmige Tracheenphänotypen identifiziert worden. Sowohl FAS2 als auch die ATPase sind an der lateralen Zellmembran lokalisiert (Hemphälä et al., 2002). Wie jedoch FASII, die ATPase

aber auch GRH auf die Zellmembranen einwirken, ist nicht bekannt. MEGA ist ebenfalls an der lateralen Membran lokalisiert und auch bei *mega* Mutanten ist der typische Tracheenphänotyp (siehe 2.4.1) erst ab st15 sichtbar. Im Gegensatz zu GRH, FAS2 und der ATPase ist MEGA aber spezifisch in den pSJs lokalisiert. Als TM-Protein besitzt es eine essentielle Funktion am Aufbau/Erhalt der SJ Struktur. In *mega* mutanten Embryonen ist die SJ Struktur zerstört. Es kommt auch zu Veränderungen der Tracheenzellform und der Tracheenäste. Offensichtlich beeinflusst MEGA über die SJs die Zellform und damit die tracheale Astlänge.

3.4 MEGA interagiert mit CORACLE und NEUREXIN

MEGA, COR und NRX besitzen ein fast identisches Expressionsmuster (siehe 2.2.6.). Zudem sind alle drei Proteine in den SJs kolokalisiert (siehe 2.2.7) und entscheidend am Aufbau/Erhalt der SJ Struktur (siehe 2.4.7; siehe 1.3.1;) und der transepithelialen Barriere (siehe 2.4.6) beteiligt. Darüber hinaus kontrollieren *mega*, *cor* und *nrx* die Größe der Tracheenäste (eigene Beobachtung), und die entsprechenden Embryomutanten besitzen vergleichbare Kutikuladefekte und weniger stark ausgeprägte Zähnenbänder (Daten nicht gezeigt).

Die vielen Gemeinsamkeiten lassen eine Interaktion der drei Proteine vermuten, da bereits eine direkte Interaktion vom COR N-Terminus mit dem NRX C-Terminus gezeigt wurde (Ward et al., 1998). COR und NRX sind für ihre gemeinsame Lokalisation in den SJs unverzichtbar. So bindet das TM-Protein NRX das zytoplasmatische COR an die Membran. COR wiederum ist ein sogenanntes „Gerüstprotein“, das NRX gezielt in den SJs lokalisiert (Ward et al., 1998). Beim Verlust eines Proteins kommt es zur basolateralen Mislokalisierung des jeweiligen Partnerproteins. Interessanterweise ist MEGA in *cor* und *nrx* mutanten Embryonen ebenfalls basolateral an der Membran mislokalisiert. Die MEGA Lokalisation ist spezifisch von COR und NRX abhängig, denn bei Verlust der SJ Proteine FAS3 (siehe 2.5.2) oder DLG (Daten nicht gezeigt) ist das MEGA Protein unverändert in den SJs zu finden. MEGA Überexpressionsstudien demonstrieren, dass auch im umgekehrte Fall MEGA für die Lokalisation von COR und NRX verantwortlich ist. Dort wo MEGA im Hinterdarm ektopisch exprimiert wird, kommt es zur spezifischen Mislokalisierung von COR und NRX, während FAS3 normal in den SJs platziert bleibt. Dies deutet auf eine direkte Interaktion von MEGA mit dem COR/NRX Proteinkomplex hin (siehe 2.5.2). Weitere Hinweise auf eine solche Interaktion bietet eine FERM-Domänen-Erkennungssequenz im N-Terminus von MEGA. Die FERM-Domäne der 4.1 Proteinfamilie, zu der COR gehört, benötigt zur Bindung eine spezifische Sequenz, wie sie Proteine der NRX Familie besitzen. Sequenzvergleiche mit der NRX-Familie zeigen, dass auch MEGA einen Teil dieser Sequenz im zytoplasmatischen N-

Terminus besitzt (Daten nicht gezeigt). Mit Bindungsstudien oder Koimmunopräzipitationen könnte gezeigt werden, ob COR tatsächlich direkt mit dem MEGA N-Terminus interagiert. COR benötigt als zytoplasmatisches Protein zur Assoziation an die Zellmembran eine Bindung über TM-Proteine. Eines dieser TM-Proteine ist NRX. Trotzdem ist COR in *nrx* mutanten Embryonen weiterhin membranassoziiert und nicht im Zytoplasma lokalisiert. Es muss also ein zusätzliches TM-Protein geben, das die Membranständigkeit des COR Proteins aufrecht erhält. MEGA könnte dieses TM-Protein sein. MEGA zeigt in *nrx* mutanten Embryonen eine basolaterale Mislokalisierung, die der von COR ähnlich ist. Die Bindung von COR an MEGA würde einerseits die Membranständigkeit und andererseits die basolaterale Mislokalisierung von COR in *nrx* Embryomutanten erklären.

3.5 MEGA ist ein *Drosophila* Claudin

Aufgrund von Sequenzvergleichen wurden mittlerweile mehr als 20 verschiedene Proteine der Familie der Claudine in Maus und Mensch (siehe 2.2.4; Tsukita und Furuse, 2002). Claudine besitzen vier TM-Domänen, und ihr N- und C-Terminus reicht in das Zytoplasma hinein. Des Weiteren haben Claudine im extrazellulären Bereich eine große und eine kleine Schleife (Tsukita und Furuse, 2002), und am C-Terminus ist bei den meisten Claudinen ein PDZ-Binde-Motiv vorhanden (siehe 2.2.4; Itoh et al., 1999). All diese für Claudine typischen Charakteristika besitzt auch das MEGA Protein (siehe 2.2.3). Abgesehen von der typischen Claudin Struktur weist MEGA auch signifikant hohe Sequenzhomologien zu Claudin-10 und -18 aus Maus und Mensch auf (siehe 2.2.4). MEGA ist demnach das erste *Drosophila* Claudin.

Ähnlichkeiten der Expressionsdomänen und der zellulären Funktion untermauern die Familienzugehörigkeit von MEGA zu den Claudinen. Claudine sind in verschiedenen Epithelien wie z.B. der Lunge, Leber, Nieren oder der Haut exprimiert (Heiskala et al., 2000; Mitic et al., 2000). MEGA ist in vergleichbaren *Drosophila* Epithelien zu finden (siehe 2.2.5). Claudine sind die Hauptbestandteile der TJ-Stränge und bilden diese, indem sie miteinander polymerisieren (Furuse et al., 1999). Zwar sind neben den Claudinen auch Occludine und Junction-Adhäsions-Moleküle (JAM) als integrale TM-Proteine in den TJs lokalisiert, sie besitzen jedoch anscheinend eine untergeordnete Rolle beim Aufbau der TJ-Stränge (Tsukita und Furuse, 1999; Tsukita et al., 2001). Jüngste Erkenntnisse zeigen, dass Claudine essentiell für die Barrierefunktion sind. Bei 18,5 Tagen alten Embryonen wurde ein massiver transepithelialer Wasserverlust gemessen. Im Gegensatz zu WT Embryonen können in Claudin-1 defizienten Embryonen biotinierte Moleküle mit einer Größe von etwa 600Da die transepitheliale Barriere passieren (Furuse et al., 2002), trotzdem sind die Claudine nicht an der Ausbildung der Zellpolarität beteiligt (Furuse et al., 2002; Sonoda et

al., 1999). Auch in *mega* mutanten Embryonen ist die Funktion der transepithelialen Barriere gestört, ohne dass dabei die Polarität der Zellen zu verändert ist. Moleküle mit einer Masse von 10kDa können die Barriere von Tracheensystem und Speicheldrüsen passieren.

In *Drosophila* sind bisher keine TJs identifiziert worden (Tepass et al., 2001). Stattdessen scheinen sich die Barriere- und Polaritätsfunktion der TJs (Übersicht: Gumbiner, 1992, Schneeberger und Lynch, 1992; Tsukita et al., 2001) in *Drosophila*-Epithelien auf zwei unterschiedliche laterale Membrankomplexe, die MZ und die SJs, aufzuteilen. Die MZ ist wie die TJs in Vertebraten apikolateral zur ZA lokalisiert. Die MZ übernimmt in *Drosophila* die Polaritätsfunktion, und mittlerweile sind mit BAZ, Dm-PAR-6, aPKC und STD gleich mehrere Proteine in den TJs bekannt, die homologe Partner in der MZ besitzen (Knust und Bossinger, 2002). Von den SJs wurde aber noch kein verwandtes Protein in den TJs identifiziert. MEGA ist daher die erste SJ Komponente, die ähnliche Proteinpartner in den TJs aufweist. Daher besitzen SJ nicht nur funktionelle, sondern vermutlich auch strukturelle Ähnlichkeiten mit den TJs.

3.6 Die *Drosophila* Claudinfamilie

Aufgrund von Sequenzhomologien und strukturellen Ähnlichkeiten mit MEGA konnten zwei weitere putative *Drosophila* (*D*)-Claudine gefunden werden (siehe 2.6). Beide, CG10624 und CG1298, weisen eine typische Claudin Struktur auf und besitzen sowohl mit MEGA als auch mit größeren Claudinen eine vergleichbare Proteinelänge. Darüber hinaus zeigen CG10624 und CG1298 ein *mega* ähnliches Expressionsmuster. Offenbar bilden MEGA und die CG10624 und CG1298 Genprodukte eine *Drosophila*-Claudinfamilie. Beitel und Krasnow identifizierten eine P-Linie, deren Embryomutanten einen *mega* ähnlichen Tracheenphänotyp besitzen. Das betroffene Gen wurde als *sinuous* (*sinu*) bezeichnet. Interessanterweise ist das *sinu*⁰⁶⁵²⁴ P-Element in die Transkriptionseinheit von CG10624 inseriert. Bei *sinu*⁰⁶⁵²⁴ und *mega* mutanten Embryonen sind die Tracheenäste verlängert (Beitel und Krasnow, 2000; siehe 2.4.1) und die epitheliale Barrierefunktion gestört (persönliche Mitteilung G.J. Beitel; siehe 2.4.6). Offensichtlich scheint daher auch das putative Claudin CG1024 (*sinu*) an der Formgebung trachealer Äste und auch an der Barrierefunktion beteiligt zu sein. Darüber hinaus haben meine Interaktionsstudien gezeigt, dass MEGA in *sinu*⁰⁶⁵²⁴ Mutanten mislokalisiert ist. Neuste Ergebnisse zeigen eine Koloalisation des SINU Proteins mit MEGA in den pSJs (persönliche Mitteilung N. Gerlach und R. Schuh). Neben MEGA und SINU ist das Genprodukt des drittes *D*-Claudins (CG1298) ebenfalls in pSJ kolokalisiert (persönliche Mitteilung N. Gerlach und R. Schuh). CG1298 defiziente Embryonen besitzen ebenfalls einen wellenförmigen Tracheenphänotyp. Anscheinend kodiert *Drosophila* drei Claudine, die

wahrscheinlich spezifisch in ektodermalen Geweben am Aufbau der SJs und der transepithelialen Barriere beteiligt sind.

Mit CG3770 und CG6982 wurden zwei weitere putative Gene identifiziert, deren Genprodukte hohe Sequenz- und Strukturähnlichkeit mit MEGA, SINU, dem CG1298 Protein und verschiedenen Claudinen aus Vertebraten aufweisen. Interessanterweise sind die CG3770 und CG6982 Genprodukte kleiner als die der drei anderen *D*-Claudine. Möglicherweise können die *D*-Claudine aufgrund von Proteingröße und Sequenzhomologien in zwei Gruppen eingeordnet werden. Der Modellorganismus *Drosophila* bietet aufgrund seiner genetischen und molekularen Möglichkeiten ein ideales System, um durch Mehrfachmutantenanalysen kombiniert mit Überexpressionsstudien die Claudinfunktionen näher zu charakterisieren.

3.7 *wurst* ist ein ektodermal transkribiertes Gen

Mutante Embryonen der P-Linie G0162 besitzen sehr markante tracheale Phänotypen. Zum einen offenbart sich ein wellenförmiger Tracheenphänotyp, der ein verlängertes Astwachstum vermuten lässt, zum anderen sehen die dorsalen Hauptstämme wie eine Aneinanderreihung „wurst-ähnlicher“-Gebilde aus (siehe 2.9.1). Aufgrund des „Wurst-Phänotyps“ erhielt das betroffene Gen den Namen *wurst*. Das *wurst*^{G0162} P-Element ist in das erste Exon des Gens CG9089 inseriert. Es gibt mehrere Hinweise, dass CG9089 *wurst* kodiert. So ist die *wurst*^{G0162} Reportergenexpression nahezu identisch mit dem CG9089 mRNA-Expressionsmuster (vgl. 2.7.3 mit 2.7.4). Außerdem ist die CG9089 mRNA-Transkription in *wurst*^{G0162} Mutanten sehr stark reduziert. Schließlich lässt sich die letale P-Insertion remobilisieren und führt dadurch zu lebensfähigen revertanten Tieren (siehe 2.8). Die eindeutige Identifizierung von *wurst* liefert schließlich eine gezielte CG9089 Überexpression, die zur Rettung der von *wurst*^{G0162} verursachten Letalität führt (siehe 2.7.2).

Neben der genetischen und molekularen *wurst* Identifizierung offenbaren aber auch der *wurst* mRNA-Expressionsverlauf und die *wurst* mutanten Tracheenphänotypen Gemeinsamkeiten. So ist die *wurst* mRNA ab st14 bis zum Ende der Embryogenese in allen Tracheenzellen aktiviert (siehe 2.7.4), während zeitgleich die verschiedenen mutanten Tracheenphänotypen ab st14 auftreten (siehe 2.9).

3.8 *wurst* ist ein Transmembranprotein mit einer DnaJ-Domäne

Der OLR von *wurst* kodiert ein 406 Aminosäuren langes putatives Protein, das sieben potentielle TM-Domänen besitzt und somit sehr wahrscheinlich membranständig ist. Des Weiteren konnte anhand der WURST Proteinsequenz eine potentielle DnaJ-Domäne

identifiziert werden (siehe 2.7.5). DnaJ-Domänen-Proteine sind an verschiedenen zellulären Funktionen beteiligt, wie z.B. an der Zuführung nicht gefalteter Polypeptidketten zum Chaperonkomplex oder am Vesikeltransport. Die bekanntesten DnaJ-Domänen-Proteine gehören zur großen Familie der Hitzeschockproteine₄₀ (Hsp40, mit 40kDa; Fink, 1999). Die Hsp40 DnaJ-Domäne ist essentiell für eine direkte Interaktion mit dem Chaperon Hsp70, das als wichtiger Bestandteil des Chaperonkomplexes an der Faltung von Polypeptidketten beteiligt ist. Hsp40 bindet vermutlich über seinen C-terminalen Zink-Finger-Komplex spezifische Substrate und führt diese über die Interaktion der DnaJ-Domäne mit Hsp70 dem Chaperonkomplex zu. Hsp40 DnaJ-Domänen Proteine werden daher auch als Co-Chaperone bezeichnet (Fink, 1999). Die DnaJ-Domäne von WURST zeigt signifikant hohe Ähnlichkeiten zu bekannten DnaJ-Domänen der Hsp40 Familie aus *Drosophila* (DROJ1; Marchler und Wu, 2001) und Mensch (Hdj1; Kazemi-Esfarjani und Benzer, 2000). Aufgrund dieser Sequenzhomologie besteht die WURST DnaJ-Domäne vermutlich aus vier α -Helices und dem hoch konservierte HPD-Tripeptid, das für die Hsp70 Bindung essentiell ist. Im Unterschied zu den Hsp40 Proteinen ist die WURST DnaJ-Domäne jedoch nicht am N-Terminus sondern am C-Terminus lokalisiert. Nur sehr wenige Proteine besitzen, ähnlich wie WURST, eine C-terminale DnaJ-Domäne. Interessanterweise ist eines dieser Proteine Auxilin, das an der Entpackung der mit Clatherin verpackten Vesikel beteiligt ist. *In vitro* Experimente zeigen, dass Auxilin über seine DnaJ-Domäne das Chaperon Hsp70 dem Auxilin-Clatherin-Komplex zuführt. Hsp70 bewirkt anschließend eine ATP abhängige Dissoziation des Clatherin-Komplexes (Jiang et al., 2000; Lemmon, 2001). Bindungsstudien der DnaJ-Domäne von WURST mit Hsp70 könnten darauf hinweisen, dass WURST an ähnlichen zellulären Prozessen beteiligt ist.

3.9 *wurst* beeinflusst die Astlänge über die tracheale Zellform

wurst^{G0162} mutante Embryonen besitzen im Vergleich zu WT Embryonen einen um 11% verlängerten DH (siehe 2.9.2). Der Grund für eine Astverlängerung ist vermutlich in einer veränderten trachealen Zellform zu finden. Statistische Auswertungen der Zellform zeigen, dass tracheale Zellen in *wurst* Mutanten um durchschnittlich 1,3 μ m also etwa um 29% verlängert sind (siehe 2.9.3). Im WT streckt sich die etwas längere Zellseite von etwa 72% der DH-Zellen entlang dem Astlumen von Anterior nach Posterior. In *wurst* Embryomutanten sind dagegen nur etwa 43% aller Zellen mit ihrer längeren Seite in einer anterioren-posterioren Ausrichtung vorzufinden. Dies würde erklären, warum in *wurst* Mutanten die durchschnittliche Astverlängerung mit 11% geringer ausfällt als die Zellverlängerung mit 29%.

3.10 *wurst* ist am Aufbau trachealer Röhren beteiligt

Zwischen st14 und st16 durchlaufen die Tracheenäste drastische morphologische Veränderungen. So weicht die apikale Tracheenzellseite in Richtung basal zurück, um dadurch einen größeren Lumendurchmesser zu gewährleisten (Beitel und Krasnow, 2000). Gleichzeitig wird an der apikalen Seite eine extrazelluläre Kutikula angelagert, die zur Versteifung der Äste dient (Manning und Krasnow, 1993). Möglicherweise ist das 2A12 Lumenantigen am Aufbau der Kutikula beteiligt. Das 2A12 Antigen ist ab st14 bis zum Ende st16, wenn die Lumina und die Kutikula der Tracheenäste voll ausgebildet sind, im extrazellulären Bereich der apikalen Zellseite vorhanden. Das Lumenantigen ist in *wurst* Mutanten bis st15 nicht nur im Lumen, sondern auch in den Tracheenzellen punktiert mislokalisiert (siehe 2.9.4). Interessanterweise ist der „Wurst-Phänotyp“ mit seinen Einschnürungen und Verdickungen des dorsalen Hauptstammes während dieser Zeit zu Beginn der 2A12 Expression und der Kutikulabildung zu beobachten (siehe 2.9.1). Wahrscheinlich greift WURST bereits sehr früh in den Aufbau der extrazellulären Kutikula ein. Weil 2A12 in *wurst* mutanten Embryonen stark konzentriert und punktiert in den Zellen fehllokalisiert ist, kann spekuliert werden, dass in solchen Mutanten Transportprozesse von der Zelle zum Lumen betroffen sein können und 2A12 Lumenantigen in Zellvesikeln angereichert vorliegt. Der „Wurst-Phänotyp“ ist mit der Annahme vereinbar, dass es möglicherweise zu einer verspäteten DH Entwicklung kommt, die mit einer Verzögerung von Transportprozessen zu erklären ist. Im Gegensatz zum WT bleibt 2A12 in *wurst* Mutanten bis zum Ende der Embryogenese im Lumen erhalten. Auch diese Beobachtung steht mit einer verzögerten Entwicklung von *wurst* mutanten Embryonen im Einklang.

3.11 *wurst* greift in die tracheale Gasfüllung ein

Nachdem WT Embryonen Lumen und Kutikula ausgebildet haben und 2A12 markiertes Antigen nicht mehr detektierbar ist, wird das Tracheensystem belüftet (Manning und Krasnow, 1993; eigene Beobachtung). Obwohl unbekannt ist, wie die Belüftung erfolgt, deuten dennoch verschiedene Beobachtungen auf einen aktiven Transportprozess hin, da die Belüftung nicht von außen über die posterioren Spirakel erfolgt. WT Embryonen können auch unter einer dicken Ölschicht ihr Tracheensystem begasen. Meine eigenen Beobachtungen zeigen, dass die Belüftung nicht in der Nähe der posterioren Spirakel, sondern in der Mitte der dorsalen Hauptstämme beginnt, indem sich zuerst kleine Lustblasen bilden, die sich vergrößern und vereinigen, um schließlich alle Lumina auszufüllen. Eine einfache Gasdiffusion von den Tracheenzellen in das Tracheenlumen ist hierbei sehr unwahrscheinlich, da Tracheenäste eine luftundurchlässige Kutikula ausbilden (Manning und

Krasnow, 1993). Es ist also anzunehmen, dass ein aktiver Gastransport in das Tracheenlumen erfolgt. In *wurst* mutanten Embryonen ist der Prozess der Gasfüllung trachealer Äste gestört. Dieser Phänotyp kann allerdings durch eine gezielte *wurst* Überexpression im Tracheensystem partiell gerettet werden. Offensichtlich ist *wurst* für die Begasung des Tracheensystems essentiell (siehe 2.9.5).

Neben *wurst* ist auch in *syntaxin-1A* (*syx-1A*) mutanten Embryonen eine fehlende Gasfüllung trachealer Äste zu beobachten. SYX-1A ist ein präsynaptisches Membranprotein, das ein Andocken oder die Fusion zellulärer Vesikel mit der Membran beeinflusst. SYX-1A wird nicht im Tracheensystem aber dafür im benachbarten PNS exprimiert (Schulze et al., 1995). Es ist nicht bekannt wie SYX-1A auf das Tracheensystem einwirkt, es wäre aber denkbar, dass eine Koordination der trachealen Belüftung über die PNS Nervenreize erfolgt. Wird *syx-1A* gezielt im Tracheensystem überexprimiert, kommt es ebenfalls zu einer vesikulären Mislokalisierung des 2A12 Antigens, wie es bei der *wurst* Überexpression zu beobachten ist (Daten nicht gezeigt; siehe 2.9.4). Die vergleichbaren trachealen Phänotypen, die durch die *syx-1A* oder die *wurst* Überexpression hervorgerufen werden, lassen eine Beteiligung von WURST an Vesikeltransportprozessen möglich erscheinen.

4 Material und Methoden

4.1 Bezugsquellen

4.1.1 Standard-Chemikalien

Produkte folgender Firmen wurden verwendet:

Baker (Deventer, Holland), Serva (Heidelberg) und Sigma (München):

Alle gebräuchlichen Feinchemikalien

Gibco-BRL (Eggenstein): Agarose, Formamid, LB-Medium und -Agar, 1kb-„Ladder“

Pharmacia-LKB (Freiburg): Repelsilane

Merck (Darmstadt): Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien (in p.A.-Qualität)

Roth (Karlsruhe): Roti-Phenol, Roti-Phenol-Chloroform

Qiagen (Hilden): Plasmid-Midi-Kit, Plasmid-Maxi-Kit, QiaexII-DNA-Extraction-Kit, QIAamp Tissue-Kit, QIAquick-Nucleotide-Removal-Kit

BioRad (Hercules) Plasmid-Mini-Kit

4.1.2 Enzyme und Enzymsets

DNA-modifizierende Enzyme und Restriktionsendonukleasen wurden von Amersham (Braunschweig), Boehringer (Mannheim), Pharmacia (Freiburg), Gibco-BRL (Eggenstein) und Biolabs (Schwalbach) bezogen.

Boehringer (Mannheim): DNA- und RNA-Labeling and Detection Kit, T4-DNA-Ligase

Sigma (München): RNaseA, DNaseI, Proteinase K

Stratagene (Heidelberg): dNTPs

Quiagen (Hilden) Hot-Star-Taq-System

Clontech (Palo Alto) Advantage2 Polymerase Mix

4.1.3 Radiochemikalien

Amersham (Braunschweig): [32 P]-dCTP

4.1.4 Geräte

Fotomikroskop: Zeiss Axiophot

LSM: Zeiss Axiophot

Elektroporationsgerät: Bio-Rad

Thermozykler: Applied Biosystems

UV-Spektrometer: Kontron

Injektor: Transjector 5246 (Eppendorf)

Absorptionsspektrometer: Kontron

Zentrifuge: Sorvall

CCD-Kamera: Kontron

Sequenziergerät: Applied Biosystems

Tischzentrifuge: Bio-Rad

4.2 Puffer und Lösungen

In der Regel wurden die Lösungen mit doppelt deionisiertem und autoklaviertem Wasser angesetzt. Die Konzentrationsfaktoren sind in Klammern angegeben. Die feucht autoklaviert Lösungen (121 °C, 45 min) sind mit "*" und sterilfiltrierte Lösungen mit "***" gekennzeichnet. Bei Lösungen, die nicht bei RT aufbewahrt werden, ist die Temperatur in Klammern angegeben. Alle Prozentangaben beziehen sich auf Gewichts- pro Volumeneinheit.

Alkalische-Phosphatase-Puffer* (4 °C):	100mM Tris/HCl (pH 9,5), 100 mM NaCl, 50mM MgCl ₂ 0,1%, Tween20
Ampicillin-Lösung (-20°C)**:	100mg/ml
Auftragspuffer für DNA (6x):	0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylen Cyanol FF, 15% Ficoll 400
BBS (10x, -20°C):	100mM Tris, 550mM NaCl, 400mM KCl, 70mM MgCl ₂ 50mM CaCl ₂ , 200mM D(+)-Glucose, 500mM Saccharose, pH 6,95
BBT (4°C):	BBS (1x), 0,1% Rinderserumalbumin, 0,1% Tween 20
Carbonatpuffer (2x):	120mM Na ₂ CO ₃ , 80mM NaHCO ₃ , pH 10,2
Chloramphenicol:	170µg/ml Ethanol
Denaturierungslösung:	0,5M NaOH, 1,5M NaCl
Denhardt's (100x, -20°C):	2% Rinderserumalbumin, 2% Ficoll 400, 2% Polyvinylpyrrolidon
DNase I-Lösung (-20°C):	10mg/ml in Wasser:Glycerin 1:1
dNTP-Lösung (-20°C):	2mM dATP, 2mM dCTP, 2mM dTTP, 2mM dGTP
DTT**:	0,1M Dithiothreitol
EDTA*:	0,5M, pH 8,0
Essigsäure:	10% & 45%
Ethidiumbromid-Lösung (4°C):	10mg/ml
Fixierlösung:	10% Paraformaldehyd in PBS, 50mM EGTA, pH 7,0
Hybridisierungslösung 2:	50% Formamid (deionisiert) 5x SSC, 200µg/ml sonifizierte, denaturierte phenolisierte Heringssperma-DNA, 100µg/ml tRNA, 50µg/ml Heparin, pH 5,0
Hybridisierungslösung-3:	50% Formamid (deionisiert) 5x SSC
Homogenisationspuffer:	0,8ml Wasser, 0,1ml 10x PCR-Puffer, 50µl 10%Nonident40, 50µl 10% Tween20
50% Klorix-Lösung:	equivalent zu 2,5% Natriumhypochlorit-Lösung
Lithiumchlorid**:	4M LiCl
Lyse-Puffer	20mM Tris/HCl pH 7.5, 200mM NaCl, 20mM EDTA, 2% SDS
Magnesiumchlorid*:	1M MgCl ₂
Magnesiumsulfat*:	1M MgSO ₄
Natriumacetat*:	3M NaAc, mit Essigsäure auf pH 6.0 (bzw. 7,0) eingestellt
NBT-Lösung:	4-Nitrobluetetrazoliumchlorid, 75mg/ml in 70% Dimethylformamid
Neutralisierungslösung:	1M Tris-HCl (pH 7,5), 1,5M NaCl
PBS (10x)*:	1,3M NaCl, 100 mM Na ₂ PO ₄ -Puffer, pH 7,4
PBT:	PBS (1x), 0,1% Tween20
Phenol (4°C, lichtgeschützt):	äquilibriert mit 50mM Tris/HCl (pH 8,0)
Proteinase K-Lösung (-20°C):	5mg/ml für Hybridisierungen an Enbryonen
RNase A-Lösung (-20°C):	20mg/ml; um DNasen zu entfernen, 20min kochen
SSC* (20x):	3M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0
SSPE (20x):	3M NaCl, 200mM NaH ₂ PO ₄ , 20mM EDTA, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt
Stopplösung (für <i>in vitro</i> -Transkription):	0,2M NaAc, 1% Essigsäure, pH 6,0
TAE-Puffer (50x):	2M Tris-Base, 50mM EDTA, mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt
TBE-Puffer (5x):	450mM Tris-Base, 450mM Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8,2
TE*:	10mM Tris/HCl (pH 8,0), 1mM EDTA
Tetracyclin-lösung (-20°C):	10mg/ml 50% Ethanol
Tris/HCl*:	1 M (pH 9,5)
X-Phosphat-Lösung:	5-Bromo-4-chloro-3-indylphosphat 50 mg/ml in Dimethylformamid

4.3 Nährmedien für Fliegen

Fliegenfutter: 8g Agar, 18g Trockenhefe, 10g Sojamehl, 80g Maismehl,
7g Rübensirup, 80g Malzextrakt, 6,3ml Propionsäure, ad 1l Leitungswasser

Apfelsaftagar: 1l Apfelsaft, 100g Zucker, 95g Agar, 40ml 15% Nipagin (in 95% Ethanol),
ad 3l Leitungswasser

Hefe: Presshefe (Bäckerhefe), mit etwas Leitungswasser zu einer geschmeidigen Masse anrühren

4.4 Nährmedien für Bakterien

LB-Medium: 10g Trypton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl ad 1l Wasser, pH der Lösung: 7,0

LB-Agar: 1l Luria-Bertani-(LB)-Medium, mit 15g Agar-Agar, pH des Agars: 7,0

Die Bakterien-Medien sowie Agars werden mit deionisiertem Wasser (ad 1l) angesetzt und anschließend autoklaviert (45 min, 121°C).

Herstellung der Platten:

LB-Agar wird aufgekocht und auf 45°C abgekühlt. Sterile Petrischalen (9cm ø) werden mit ungefähr 20ml flüssigem Agar gefüllt und bei RT stehen gelassen, bis der Agar erstarrt ist. Nicht sofort verwendete Platten werden bei 4°C aufbewahrt. Antibiotika haltige Agarplatten werden während des Abkühlens mit dem jeweiligen Antibiotikum vervollständigt.

4.5 Molekularbiologische Arbeitstechniken

Wenn nicht anders beschrieben wurden Standard-Methoden nach den Protokollen von Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

4.5.1 Vektor zur Amplifikation und Subklonierung

Für die Klonierung genomischer DNA-Fragmente und cDNA aus *Drosophila* werden pBluescript (pBstII-KS und pBstII-SK, Stratagene Cloning Systems) und pOT2 (kloniert von Oron Hubbard; <http://www.fruitfly.org/EST/pOT2avector.html>) zur Amplifikation in Bakterien und Sequenzierungen verwendet. Aufgrund der α -Komplementationsfähigkeit wird bei Verwendung entsprechender Bakterienstämme eine Selektion auf β -Galaktosidaseaktivität durchgeführt.

4.5.2 Bakterienstämme

XL 1-Blue (Stratagene): *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*($r_K^- m_K^+$), *supE44*, *relA1*,
 Δ , Δ (*lac*), {F', *proAB*, *lacI_q* Z Δ M15, Tn10(*tet^R*)}

Kurzfristig Lagerung: Bakterienstämme wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen, ü. N. bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C aufbewahrt. Langfristig Lagerung: 500µl der ü.N.-Kultur eines Bakterienklons werden mit 500µl 70% Glycerin (v/v) versetzt, gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 70°C gelagert.

4.5.3 Extraktion genomischer DNA

A.) (QIAGEN, QIAamp Tissue Kit) Ungefähr 50 durch Kälteschock getötete Fliegen werden zur DNA Isolierung in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt, 180µl PBS zugegeben und mechanisch homogenisiert. Die weitere Prozedur entspricht der Anleitung des QIAamp Tissue Protokolls.

B.) Einzelne oder bis zu 10 Embryonen/Larven/Fliegen werden mit 200µl Lyse-Puffer in einem Eppendorfggefäß mit einem Mörser homogenisiert. Das Homogenat wird mit 15µl ProteinaseK (10µg/µl) versetzt und 60min bei 56°C inkubiert. Anschließend findet eine (25:24:1) Phenol-Chloroform-Extraktion statt (siehe 4.5.4). Um RNA zu entfernen führt man bei 37°C und 10min mit 5µl eine RNaseA (10µg/µl; Qiagen) Reaktion durch. Hiernach ist eine Chloroform:Isoamylalkohol-Extraktion (siehe 4.5.4) erforderlich. Die Fällung der DNA erfolgt mit Ethanol (siehe 4.5.5).

4.5.4 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Zu einer Nukleinsäurelösung wird ein gleiches Volumen Phenol gegeben und gemischt bis sich eine Emulsion bildet. Diese Emulsion wird zentrifugiert (Tischzentrifuge, 15000Upm, 2min, RT), die wässrige Phase wird in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Das restliche Phenol wird mit einem Volumen Chloroform:Isoamylalkohol entfernt. Nach der Phasentrennung wird wieder die wässrige Phase in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Um die von Proteinen gereinigte Nukleinsäure zu isolieren, wird eine Ethanol- oder Isopropanolfällung (siehe 4.5.5) durchgeführt.

4.5.5 DNA-Präzipitation

A.) Ethanolfällung

Zu nukleinsäurehaltigen Lösungen werden 1/10 Volumen 3M NaAc (pH 6,0) und 2 bis 3 Volumen 100%iges Ethanol zugegeben, gemischt, 15min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (15000Upm, 15min, RT). Das DNA-Pellet wird mit 70%igem Ethanol

gewaschen (5min, RT), abzentrifugiert (15000Upm, 10min, RT), getrocknet (bei RT) und in TE-Puffer (pH 8,0) gelöst.

B.) Isopropanolfällung

Die Fällung erfolgt im Prinzip wie unter 4.5.5.A beschrieben. Nach Zugabe von 3M NaAc (pH 6,0) wird jedoch das 0,6fache Volumen Isopropanol zugegeben, gemischt und für mindestens 10min bei RT inkubiert.

C.) DNA/Protein-Konzentrationsbestimmung (UV-Absorptionsmaximum)

Nukleinsäuren besitzen für UV-Strahlen ein Absorptionsmaximum bei 260nm, das zur Konzentrationsbestimmung DNA-haltiger Lösungen im Photometer verwendet wird. Es gilt:

$$1 \text{ OD}_{260} = 47,5\mu\text{g dsDNA/ml}$$

$$1 \text{ OD}_{260} = 37,5\mu\text{g ssDNA/ml}$$

Proteine absorbieren bei 280nm, eine Verunreinigung der DNA kann daher mittels der Warburgschen Formel berechnet werden:

$$(1,45 \times \text{OD}_{280}) - (0,74 \times \text{OD}_{260}) = \text{mg Protein/ml}$$

Der Quotient $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ liegt bei einer DNA-Präparation bei 1,8. Gemessen wurde mit einem Uvikon UV-Spektrometer (Kontron, Echingen)

4.5.6 Restringieren der DNA

Restriktionsendonukleasen (TypII) werden verwendet, um DNA zu charakterisieren, zu isolieren oder zu linearisieren. Für analytische Zwecke werden je 1µg DNA bzw. 0,5µg Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen in einem Endvolumen von 20 bis 40µl in der Regel für 2Std. bei 37°C inkubiert. In präparativen Fällen werden entsprechend größere Mengen DNA verwendet und gegebenenfalls länger mit den Restriktionsenzymen behandelt (2-5Std.). Gemäß den Pufferansprüchen der Enzyme werden die Restriktionen in verschiedenen Puffertypen (A-, B-, L-, M-, H-Puffer und spezielle Puffer nach Boehringer) durchgeführt.

4.5.7 Dephosphorylierung restringierter DNA

Die Dephosphorylierung verhindert, dass Plasmid-DNA nach der Restriktion aufgrund komplementärer Einzelstrangüberhänge mit sich selbst ligiert. Daher werden 1-10U Alkalischer Phosphatase nach der Restriktion zu dem Lösungsansatz hinzu pipettiert. Die Dephosphorylierung erfolgt für 15min bei 37°C. Das Enzym wird hiernach durch eine Inkubation bei 65°C für 15min deaktiviert.

4.5.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Restringierte Vektor-DNA wird mit zwei- bis dreifachen molaren Überschuss des isolierten DNA-Fragments mit 1/10 Volumen 10x Ligationspuffer und 1U T4-DNA-Ligase für 7-18Std. bei 18°C ligiert.

4.5.9 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

DNA-Fragmente werden in Abhängigkeit von ihrer Länge in verschiedenen konzentrierten Agarosegelen (0,6-1,5%) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarose (Gibco BRL, Eggenstein) wird durch Aufkochen in 0,5x TBE-Puffer gelöst, Ethidiumbromid-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 40µg/100ml zugefügt und die etwas abgekühlte Agaroselösung in eine Gelwanne gegossen, in die zum Aussparen der Geltaschen ein Kamm eingehängt worden ist. Das erkaltete Gel wird in die Elektrophoresekammer gelegt, der Kamm gezogen und mit 0,5x TBE-Puffer gefüllt, bis das Gel bedeckt ist. Die DNA-Proben werden mit 1/10 Volumen Auftragspuffer gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese wird im Spannungsbereich von 20-130 Volt durchgeführt. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wird ein Längenmarker (1kb-„Ladder“, Gibco-BRL) mit aufgetrennt. Die DNA-Banden werden auf dem UV-Transilluminator bei 366nm sichtbar gemacht und das Gel zur Dokumentation mit dem „Video-Copy-Prozessor“ photographiert.

4.5.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die entsprechenden DNA-Banden werden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und gewogen. Die Extraktion wird mit dem „QIAEXII-DNA-Extraction-Kit“ durchgeführt entsprechend der Anleitung des beiliegenden Protokollheftes.

4.5.11 Herstellung von markierter antisense-RNA durch *in vitro*-Transkription

Antisense-RNA wird als sensible Probe für *in situ*-Hybridisierungen an Embryototalpräparaten verwendet und mit dem „Boehringer-DIG-RNA-Labeling-Kit“ hergestellt. Dazu werden 1µg linearisierte Plasmid-DNA mit dem entsprechenden Insert und Promotoren zusammen mit Wasser (dest.), 1µl 10x Transkriptionspuffer, 1µl NTP-Markierungsgemisch, 1µl RNase-Inhibitor (20U) und 1µl der entsprechenden RNA-Polymerase (T7, T3 oder SP6) gemischt, zentrifugiert und 2Std. bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 15µl Wasser (dest.), 25µl 2x Carbonatpuffer und Inkubation für 30min bei 70°C gestoppt und die antisense-RNA durch Hydrolyse partiell in kleinere Fragmente zerlegt. Die Hydrolyse wird durch Zugabe von 50µl Stopplösung beendet und die

RNA mit 10µl 4M LiCl, 10µl tRNA (20mg/ml) und 300µl absolutem Ethanol entweder für mindestens 2Std. oder ü. N. bei -20°C gefällt. Das Pellet wird mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 150µl Hybridisierungslösung² gelöst.

4.5.12 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Um Vektoren zu propagieren werden zur DNA-Aufnahme kompetente Zellen benötigt. Dazu impft man 50ml LB-Medium mit Tetracyclin (10µg/ml) mit einer XL-1 Kolonie an und inkubiert auf dem Schüttler bei 37°C ü.N. 1l LB-Medium wird mit 20ml dieser Kultur angeimpft und man lässt die Bakterien bis zu einer optischen Dichte bei 600nm (OD₆₀₀) von 0,5 bis 0,7 bei 37°C auf dem Schüttler wachsen. Ab jetzt erfolgen alle Schritte auf Eis bzw. bei 4°C. Dann werden die Zellen bei 4000Upm für 10min abzentrifugiert. Zum Pellet gibt man 300ml 4°C kaltes 10%iges steriles Glycerin und resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation werden die Zellen in 100ml, 50ml und zum Schluss in 2ml 10%igem sterilem Glycerin resuspendiert. Die kompetenten Zellen werden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff Schock-gefroren und bei -80°C gelagert.

4.5.13 Bakterientransformation durch Elektroporation

Ein Aliquot der eingefrorenen kompetenten *E.coli* XL-1 Zellen (siehe 4.5.12) wird auf Eis aufgetaut, 50µl davon mit 1-2µl der DNA-Lösung gemischt und in einer Elektroporationsküvette (BioRad) gegeben. Anschließend wird der "Pulse-Generator/Capacitor" auf folgende Parameter eingestellt: 25µFD, 1,8kV, 200W. Die Küvette wird in den vorgekühlten Schlitten gestellt und die Spannung angelegt. Sofort werden 250µl LB-Medium in die Küvette pipettiert, gemischt und mindestens 30min bei 37°C in einem Eppendorfreaktionsgefäß inkubiert. Die Bakteriensuspension wird auf einer für das Selektionssystem geeigneten Agarplatte (Ampicillin, Chloramphenicol) ausplattiert. Nach Inkubation der Platten ü.N. bei 37°C können rekombinantes Plasmid enthaltende Bakterienkolonien erkannt werden.

4.5.14 Plasmid-DNA-Mini-/Midi-/Maxi-präparation

(BioRad Plasmid Mini-Kit; Quiagen Plasmid Midi/Maxi- Kit)

Mini-Präparation: 3ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wird mit einer von einer Agarplatte gepickten Bakterienkolonie angeimpft und Ü.N. bei 37°C geschüttelt. Die weitere Vorgehensweise entspricht der vorgeschlagenen Anleitung des BioRad Mini-Kits.

Midi-Präparation: 50ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wird mit einer von einer Agarplatte gepickten Bakterienkolonie angeimpft und Ü.N. bei 37°C geschüttelt.

Maxi-Präparation: Statt 50ml werden hier 150ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikum angeimpft. Die weitere Prozedur der Midi und Maxi-Präparation entspricht den vorgeschlagenen Anleitungen des Quiagen-Plasmid-Midi/Maxi-Kits.

4.5.15 Plasmidrettungs-„plasmid rescue“-Verfahren

Genomische DNA wird aus einer Fliegenlinie (siehe 4.5.3) isoliert. Um dabei das P-Element flankierende genomische DNA isolieren zu können wird ein präparativer Restriktionsverdau (siehe 4.5.6) jeweils mit den Restriktionsenzym EcoRI oder SacII mit 42µl DNA und einem Gesamtvolumen von 50µl durchgeführt. Anschließend werden die Enzyme bei zwanzigminütiger Inkubation bei 65°C deaktiviert. Durch den Restriktionsverdau wird mit der genomischen DNA ein Teil des P-Elementes hydrolysiert. Dieser Teil des P-Elementes enthält zur Selektion das Ampicillinresistenzgen und zur Replikation den *E.coli*-ori. Die Ligation der DNA-Fragmente erfolgt mit dem gesamten 50µl Ansatz, 5U T4-DNA-Ligase und 1/10 Volumen 10x Ligationspuffer bei einem Endvolumen von 200µl für 6Std. bei 18°C. Zur Aufreinigung der ligierten DNA-Fragmente wird eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 4.5.4) und eine anschließende Isopropanolfällung (siehe 4.5.5) durchgeführt. Die so zu einem Plasmid ligierten und aufgereinigten DNA-Fragmente werden nun in elektrokompente Bakterienzellen (siehe 4.5.12) transformiert (siehe 4.5.13) und der gesamte Ansatz (250µl) kann auf eine Agarplatte, die Ampicillin enthält, auf das Ampicillinresistenzgen selektioniert werden. Danach wird mit einer von der Agarplatte gepickten Bakterienkolonie LB-Medium angeimpft, um eine DNA-Midi-Präparation (siehe 4.5.14) durchführen zu können. Die DNA kann nun zur Sequenzierung genutzt werden.

4.5.16 Vervielfältigung genomischer DNA mittels der PCR

Die PCR (Polymerase Kettenreaktion, englisch: polymerase chain reaction) wird zur Amplifikation kleinster DNA-Mengen genutzt. Hierbei wird die Matrizen-DNA denaturiert, so dass sich Oligonucleotide an die DNA-Stränge und Gegenstränge anheften können, die wiederum als Erkennungspunkt zur Vervielfältigung der DNA-Stränge durch eine hitzestabile Polymerase benutzt werden (siehe auch 4.5.16). Die Oligonucleotide wurden von der MWG-BiotechAG (Ebersberg) hergestellt. Um bei EMS-induzierten *mega* mutanten Embryonen den OLR auf Mutationen untersuchen zu können, werden einzelne Embryonen dechorioniert (siehe 4.6.10), mit PBT gewaschen und mit 10µl Homogenisationspuffer versetzt. Nach dem

Zerquetschen der Embryonen mit einer Pipettenspitze in einem PCR-Eppendorfgefäß werden 4µl der Lösung mit 16µl ProteinaseK/PCR-Puffer (0,9ml Wasser, 100µl 10x PCR-Puffer, 2,5µl ProteinaseK [20mg/ml]) für 1Std. bei 50°C und 10min bei 95°C im Thermozykler behandelt. Aus dem Mix nimmt man 10µl und mischt sie mit 20µl aus einem „Master-Mix“ (2µl 10x PCR-Puffer, jeweils 2µl [20pg] Oligonucleotide, 5µl [2,5mM] dNTP's, 10µl Wasser [dest.] 1µl Taq Advantage2 [Taq Polymerase = entstammt ursprünglich aus dem extrem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*]), Die Oligos hybridisieren proximal und distal zum OLR im Bereich der genomischer DNA. Die PCR wird in dem Thermozykler folgendermaßen durchgeführt:

1 Zyklus:	10min	95°C
33 Zyklen:	45sek	95°C
	45sek	56°C
	2min	68°C
1 Zyklus:	10min	68°C

Nach Beendigung der PCR werden die hergestellten etwa 1,1kb großen DNA Fragmente auf 4°C abgekühlt, die DNA auf einem Elektrophoresegel aufgetrennt (siehe 4.5.9), die entsprechende Bande ausgeschnitten (siehe 4.5.10), isoliert und zum Sequenzieren gegeben (siehe 4.5.17).

Um bei geretteten *wurst* P-mutanten Tieren (siehe 2.7.2) das jeweilige P-Element identifizieren zu können, muss aus einzelnen Fliegen genomische DNA gewonnen werden (siehe 4.5.3). Mit geringen Mengen (100ng) dieser DNA wird eine PCR mit dem Hot-Star-Taq-System durchgeführt. Für die PCR-Reaktion sind 33 Zyklen notwendig, wobei die Taq-Polymerase zur Aktivierung vorweg 15min bei 95°C inkubiert wird. Da es sich um etwa 2,5kb großen DNA-Fragmenten handelt werden der Extension 2,5min eingeräumt:

1 Zyklus:	15min	95°C
33 Zyklen:	45sek	95°C
	45sek	56°C
	2,5min	72°C
1 Zyklus:	10min	72°C

Nach der PCR trennt man etwa 500ng der hergestellten DNA in einem Agarosegel elektrophoretisch auf (siehe 4.5.9). Da die Oligonucleotide entweder 1,5kb proximal oder 1kb distal vom P-Element oder im P-Element selber hybridisieren, erhält man im WT ca. 2,5kb große Fragmente und in der P-Mutanten etwa 1kb Fragmente (Abb.2.26,B).

4.5.17 Vorbereitung der DNA zur Sequenzierung

Ausgehend von 200-500ng doppelsträngiger DNA kann der zwischen zwei Oligonukleotid-Primern gelegene Sequenzbereich durch wiederholte Zyklen von Hitzedenaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese exponentiell vermehrt werden. Hierfür ist der eine Oligonukleotidprimer komplementär zu einem Sequenzbereich am 3'-Ende des P-Vektors und es erfolgt eine Amplifikation der DNA vom proximalen Ende des genomischen DNA-Fragments. Der andere Oligonukleotidprimer ist zu einem Bereich am 5'-Ende des P-Vektorteilfragments komplementär und die Amplifikation der DNA erfolgt in das distale Ende des genomischen DNA-Fragments hinein. Aufgrund des Denaturierungsschrittes wird die hitzestabile Taq-Polymerase verwendet. Die weitere Vorgehensweise entspricht dem vorgeschlagenen Protokoll der Fa. Applied Biosystems („Preparing Sequencing Reactions“, „Ethanol/Sodium Acetate Precipitation Procedure“).

4.5.18 Automatisierte DNA-Sequenzierung

Alle Klone wurden mit einer automatischen Sequenzierungsmaschine von Applied Biosystems (ABI Prism 377/96) und dem DNA Sequenzierungssystem (Applied Biosystems) sequenziert. Dabei wird eine modifizierte Version der Kettenabbruchmethode verwendet. Bei jeder der vier Reaktionen (G, A, T, C) wird der Primer mit einem unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff markiert, so dass ohne Radioaktivität gearbeitet werden kann. Die vier getrennt ablaufenden Reaktionen werden auf das Gel in eine gemeinsame Probenflasche gegeben. Am Ende des Gels tastet ein Laser die vorbeilaufenden Banden auf ihre Fluoreszenzeigenschaften ab, welche dann mit Hilfe eines Computers abgespeichert und in eine Nukleotidsequenz umgewandelt werden.

4.5.19 Computer-Sequenz-Analysen

Zur computergestützten Sequenzanalyse wurden die Programme MacMolly Tetra Analyze, MacMolly Tetra Complain und DNA-Star Edit Seq., OLIGO ® Primer Analysis und Meg. Align verwendet.

Die Proteinsequenzen wurden mit Hilfe der Programme TMHMM2.0 („Transmembrane hidden Markov Model“), DAS („Dense Alignment Surface“), NetPhos und Signal-IP untersucht. Die aufgeführten Programme sind unter folgenden Internetadressen frei zugänglich: CBS (CENTER FOR BIOLOGICAL SEQUENCE ANALYSIS; www.cbs.dtu.dk), PredictProteinserver (www.cubic.bioc.columbia.edu/pp/), SMART (Simple Modular Architecture Research Tool; www.smart.embl-heidelberg.de).

4.5.20 Affinitätschromatographische Aufreinigung der anti-MEGA Antisera

Die anti-MEGA Antikörper entstammen zum einen aus Kaninchen-Seren und zum anderen aus Meerschweinchen-Seren. Die Herstellung der Peptide, die Immunisierung und die Blutabnahmen wurden von eurogentec (Brüssel) durchgeführt. Von MEGA wurden zwei Meerschweinchen und zwei Kaninchen mit Peptiden, die N-terminale (1-MRELNKQQSQD TTDS-15+C) und C-terminale (C+238-GYQPPRHHHSQSRSL-252) MEGA Proteinsequenzen besitzen, dreimal immunisiert. Die Seren der Endblutungen wurden zur spezifisch Aufreinigung benutzt.

Die Affinitätschromatographie erfolgte mittels einer Thiopropyl-SepharoseTM6B-Matrix (Amersham, Braunschweig) in Anlehnung an das von Amersham vorgeschlagene Protokoll. Die Puffer müssen entgast werden, ihre Zusammensetzung kann in dem Protokoll von Amersham nachgelesen werden. Die Aufreinigung über Thiopropyl-SepharoseTM6B-Matrix ist aufgrund der zusätzlichen an die Peptide angehängten Cysteine deshalb möglich, weil die Schwefelreste der Cysteine eine Thiol-Verbindung mit der Matrix eingehen, so dass die Peptide stabil an die Sepharose gekoppelt sind. Zuerst wird das Säulenmaterial (0,8gr pro Säule = etwa 3ml finale Matrix) mit 4x 50ml Wasser (dest.) in einem Falcongefäß insgesamt 1Std. gewaschen. Die Säule wird je Waschschrift bei 500Upm zentrifugiert, der Überstand entnommen und neues Wasser hinzugegeben. Gleichzeitig werden die Peptide im Kopplungspuffer (engl. coupling-buffer) mit der Konzentration von 0,5 bis 10mg Protein pro 1ml Puffer aufgenommen. Hiervon werden dann 0,5ml mit 4ml Kopplungspuffer verdünnt und zur aufgereinigten Säulenmatrix hinzugegeben und im ü.N. (mindestens 16Std.) bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt eine Messung vom nichtgebundenen Proteinen aus dem Überstand ($\text{Absorption}_{280} - \text{Absorption}_{343}$), um die Menge an gebundenen Peptiden zu bestimmen. Der Überstand kann bei -80°C aufbewahrt werden. Die Matrix wird zum Blocken der Gruppen, an denen kein Peptid gebunden ist, anschließend 4Std. bei 45°C im Wasserbad mit 1M Ethanolamin behandelt. Danach wird die Matrix mit Kopplungspuffer, Wasser und einem Acetat-Puffer (siehe Protokoll, alle bei pH 7-8) gewaschen und dann mit Natriumacetat pH4 behandelt. Schließlich erfolgt die Bepackung der Säule (BioRad, Hercules) mit 3ml Matrix, wobei die Bildung von Luftbläschen vermieden werden muss. Alle weiteren Schritte sind bei 4°C durchzuführen. Damit die Matrix nicht austrocknet, muss die Säule mit dem Natriumacetat-Puffer gefüllt werden. Die Säule wird an einer Pumpe angeschlossen, so dass die durch die Säule geflossenen Puffer aus einen Auffangbehälter absaugt und in die Säule zurückgepumpt werden können. Dieser Kreislauf ermöglicht einen stetigen Durchfluss von Lösungen und Seren. Vor der Serumzugabe muss die Säule mit Bindungspuffer (engl.: binding-buffer pH7,5) gewaschen werden. Anschließend wird 2,5ml des Serums mit 22,5ml Bindungspuffer verdünnt und bei langsamer Durchflussrate ü.N. durch die Säule gepumpt. Am nächsten Tag wird die Säule mit reinem Bindungspuffer

gewaschen. Die anschließende Elution erfolgt mit 6ml 100mM Glycin pH2,5, das in drei Fraktionen zur Säule gegeben wird. Das Glycin wird in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und mit Tris/HCl-Puffer (pH 9,5) auf pH 7 umgepuffert. Zum Erhalt der Antikörper müssen BSA und Natriumazid hinzugegeben werden. Die aufgereinigte Antikörperlösung kann bei –80°C oder bei –20°C gelagert werden. Die Aufreinigung des Serums kann bei Erfolg mehrfach wiederholt werden. Die Säule ist anschließend zu reinigen, um sie bei 4°C lagern zu könne (siehe Amersham Protokoll).

Bei MEGA wurde der Aufreinigungsprozess mehrfach mit neuem Serum wiederholt. In allen Fällen wurde der anti-MEGA Antikörper mit Hilfe einer TSA-Färbereaktion (siehe 4.6.12) an Embryonen getestet. Bei MEGA aus dem Kaninchen, hat sich das C-terminale Peptid und bei MEGA aus dem Meerschweinchen das N-terminale Peptid als sehr effektiv erwiesen.

4.6 Embryologie und Genetik

4.6.1 Fliegenstämme

Als Wildtyp-Stamm dient *Oregon R*. EMS induzierte Mutantenlinien und P-Element tragende Linien, wurden zur Identifizierung homozygoter Embryonen und Larven entweder mit einem Balancer-Chromosom gekreuzt, das ein bakterielles *lacZ* Gen unter der Kontrolle cis-regulatorischer Elemente des *ftz* Gens oder ein P-Element mit dem Gen für „grün-fluoreszierendes Protein (GFP)“ besitzt. Allgemeine Methoden der Genetik und der Embryologie sind in Ashburner (1989) und Greenspan (1997) beschrieben. Eine Liste der verwendeten Fliegenlinien befindet sich in Abschnitt 4.6.18.

4.6.2 Fliegenhaltung

Die Fliegen werden in verschieden großen Kunststoffbechern gehalten, die zu etwa einem Viertel mit Futter gefüllt sind. Um den Puppen und geschlüpften Fliegen ein festes Substrat zu geben, wird ein Faltenfilter in das Futter gesteckt. Die Becher sind durch mit Watte umwickelten Schaumstoffstopfen verschlossen. Je nach gewünschter Generationsdauer werden die Fliegenstämme bei 18°C bzw. 25°C gehalten. Alle 2 bis 4 Wochen werden die Fliegen in frische Futterbecher umgesetzt. Um Kreuzungen vornehmen zu können werden Fliegen über eine Fritte mit Kohlendioxid kurzfristig betäubt und entsprechend ihrer phänotypischen Marker gesammelt.

4.6.3 Keimbahntransformation zur Herstellung transgener Fliegenlinien

Um transgene UAS-Konstrukte tragende Fliegenlinien von *mega* und *wurst* herstellen zu können, ist die DNA aus den entsprechenden ESTs isoliert, restringiert und mit dem P(UAS)-Vektor vereint worden. Das erhaltene DNA-Konstrukt wird in etwa 300 frisch gelegte genotypische Df(1)w^{67c23} Embryonen (0-30min) injiziert (bei *mega* und *wurst* freundlicherweise von H. Taubert durchgeführt). Die schlüpfenden jungfräulichen transgenen Fliegen werden mit OreR Fliegen gekreuzt. Die transgenen Tiere sind anschließend in der Tochtergeneration aufgrund des *white* Gens im P-UAS-Vektors anhand ihrer roten Augenfarbe identifizierbar. Die chromosomale P-Lokalisation transgener Fliegenlinien kann dann anschließend mittels verschiedener Balancer-Chromosom ermittelt werden. Außerdem können so stabile Fliegenstöcke mit homozygoten P-Konstrukten hergestellt werden.

4.6.4 Ektopische Genexpression mit Hilfe des UAS-GAL4-Systems

Die Funktion des UAS-GAL4 induzierten Expressionssystems (Brand und Perrimon, 1993) erfolgt durch eine Zusammenführung eines Induktorkonstruktes (GAL4-Konstrukte, integriert in Fliegenstämme) und eines Effektorkonstruktes mit einer beliebigen Transkriptionseinheit (UAS-Konstrukt, integriert in Fliegenstämme). Durch das Kreuzen zweier solcher transgenen Fliegenstämme erfolgt in der Nachkommenschaft die ektopische Expression eines Gens. Bei UAS-*mega* und UAS-*wurst* wurde eine ektopische Expression der Gene bei 22°C oder bei 25°C durchgeführt.

4.6.5 Generierung von *mega*-Keimbahnchimären

Um die maternale MEGA Komponente ausschalten zu können mussten Keimbahnchimäre nach dem Prinzip von Chuo und Perrimon (1992) mit dominanten Markern und einem Heferekombinasesystem (FRT-FLP) hergestellt werden.

A:) Zur Herstellung der Linien werden heterozygote *mega*^{G0012} oder *mega*^{VE896} mutante Weibchen mit Männchen der FRT-Linie gekreuzt. In der F1-Nachkommenschaft können dann heterozygote Weibchen, die ein *mega* und ein FRT Allel besitzen aufgrund ihrer dunkelroten Augenfarbe („mini-*white*“ und *white* Gen der *mega* und FRT P-Elemente) identifiziert und mit FM7c Männchen gekreuzt werden. Hierbei erfolgt in der Keimbahn die Rekombination der *mega* Mutation mit FRT¹⁰¹. In der F2-Generation erscheinen heterozygote Weibchen mit dunkelroten halbmondförmigen (Bar von FM7c) Augen. Zur Erstellung stabiler Fliegenstöcke werden diese rekombinanten Weibchen aus der F2 mit FM7c Männchen gekreuzt.

P:	<i>mega</i> /FM7c	X	y,w,v ²⁴ ,FRT ¹⁰¹ /y
F1:	<i>mega</i> /FRT ¹⁰¹	X	FM7c/y
F2:	<i>mega</i> , FRT ¹⁰¹ /FM7c	X	FM7c/y

B.) Um eine gerichtete, durch Hitzeschock induzierte Rekombination hervorzurufen, müssen die Hitzeschock-Flipase (FLP), die FRT-Sequenz und der ovo^{D1} Sterilitätsmarker in einem Fliegenstamm kombiniert werden. Hierfür werden heterozygote jungfräuliche Weibchen mit einem *mega*,FRT Rekombinationsereignis mit Männchen gekreuzt, die FLP, FRT¹⁰¹ und ovo^{D1} besitzen. In Fliegenröhrchen wird dann eine 24Std. Ei-Ablage gesammelt, deren Embryonen bzw. Larven nach 24Std. und nach 48Std. der Befruchtung jeweils einen einstündigen 37°C Hitzeschock bekommen. Aus diesen Röhrchen werden dann Jungfrauen mit dunkelroten runden Augen gesammelt und mit WT Männchen oder mit FM7-Männchen vereint. Zur Letalitätsbestimmung wird FM7i-*actin*-GFP als Balancer-Chromosom benutzt.

P:	<i>mega</i> , FRT ¹⁰¹ /FM7c	X	ovo ^{D1} , FRT ¹⁰¹ /y ; FLP/FLP
F1:	<i>mega</i> , FRT ¹⁰¹ / ovo ^{D1} , FRT ¹⁰¹ /y ; FLP/+	X	FM7c/y

4.6.6 Komplementationstudien und Generierung transheterozygoter *mega* Mutanten

Um zu überprüfen, ob die P-Linien G0012 und G0044 neue Allele von *mega* darstellen wurde ein Komplementationstest durchgeführt. Hierfür generiert man transheterozygote Weibchen die sowohl ein EMS-induziertes Allel, als auch ein P-Allel besitzen. Da sich die P- und EMS induzierten Mutationen letal auswirken (Peter et al, 2002; Perrimon et al., 1989), dürfen keine transheterozygoten Weibchen überleben, wenn P- und EMS-induzierte Mutation eine Komplementationsgruppe bilden.

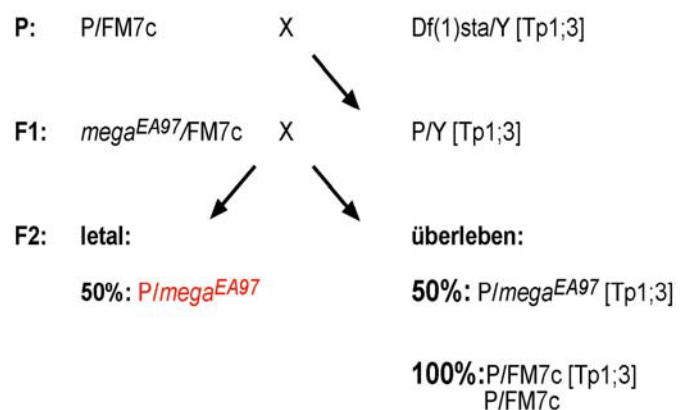
Für die Herstellung transheterozygoter Weibchen werden zuerst heterozygote *mega*^{G012} oder *mega*^{G044} Weibchen mit der Df(1)sta;[Tp1;3]sta-Linie, die *mega* defizient ist und gleichzeitig eine Duplikation der genomischen Region von *mega* (1E1-2B4) auf dem dritten Chromosom trägt, gekreuzt. Die in der F1 resultierenden homozygoten P-Männchen (*mega*^{G012}, *mega*^{G044}) sind aufgrund der Duplikation [Tp1;3] lebensfähig und können sich daher mit heterozygoten *mega*^{EA97} Weibchen paaren. In der F2-Generation besitzt jedoch die Hälfte der erzeugten transheterozygoten *mega*^{G012}/ *mega*^{EA97} Weibchen die Duplikation [Tp1;3] und sind somit lebensfähig und deshalb ist ein einfacher Test auf Letalität nicht möglich (Abb.4.1). Eine Auszählung und statistische Auswertung aller überlebender Weibchen ist deshalb notwendig. Bilden die *mega*^{G012} und *mega*^{G044} mit *mega*^{EA97} eine Komplementationsgruppe, dann überleben nur 50% der transheterozygoten Weibchen mit einer Duplikation, während die anderen 50%, die keine Duplikation besitzen, sterben. Die heterozygote Weibchen (100%;

mega^{G012}/FM7c) sind lebensfähig. Bilden die Mutationen keine Komplementationsgruppe, dann überlebt eine gleich hohe Anzahl transheterozygoter, wie heterozygoter Weibchen.

Abb.4.1: Kreuzungsschema für den Komplementationstest der Linien G0012 und G0044 mit den *mega* EMS-Linien.

Kreuzungsschema für die *mega* Komplementationsanalyse. **(P):** Weibchen der *mega* P-Linien werden mit Männchen gekreuzt, die eine Duplikation der genomischen *mega* Region auf dem dritten Chromosom tragen [Tp1;3] und gleichzeitig *mega* defizient sind [Df(1)sta]. **(F1):** Homozygote *mega*^{G012} und *mega*^{G044} Männchen überleben nur deshalb, weil

sie die Duplikation [Tp1;3] besitzen und sie können daher mit heterozygoten *mega*^{EA97} Weibchen gekreuzt werden. **(F2):** *mega*^{G012} und *mega*^{G044} bilden mit *mega*^{EA97} eine Komplementationsgruppe, 50% der transheterozygote Weibchen sterben (rot), die restlichen 50% überleben wegen der Duplikation. Die Statistik zeigt, dass doppelt so viele (100%) heterozygote Weibchen überleben.



G0012	genetischer Hintergrund	überlebende Fliegen	Verhältnis in %
Negative Kontrolle:	(G00162 / G0012)	400	105%
	(FM7c / G0012)	378	
Positive Kontrolle:	(G0012 / G0012)	213	51%
	(FM7c / G0012)	407	
Allelitätstest:	(<i>mega</i> ^{EA97} / G0012)	199	45%
	(FM7c / G0012)	458	
G0044	genetischer Hintergrund	überlebende Fliegen	Verhältnis in %
Negative Kontrolle:	(G00162 / G0044)	495	110%
	(FM7c / G0044)	448	
Positive Kontrolle:	(G0044 / G0044)	201	43%
	(FM7c / G0044)	463	
Allelitätstest:	(<i>mega</i> ^{EA97} / G0044)	95	47%
	(FM7 / G0044)	184	

Tabelle 4.1: Überlebende Tiere des *mega* Komplementationstests. G0012 und G0044 (in Chromosomenabschnitt 2A4 inseriert) wurden auf Komplementation mit der *mega*^{EA97} Linie getestet. Hierfür wurden transheterozygote Weibchen generiert, die das EMS Allel *mega*^{EA97}- und ein P-Allel von *mega*^{G0012} oder *mega*^{G0044} besitzen (Abb.4.1). Bilden die Mutationen eine Komplementationsgruppe, so wirken sich diese letal auf die transheterozygoten Weibchen aus. Die Hälfte aller generierten transheterozygoten Weibchen besitzt jedoch eine zum Überleben befähigende Duplikation [Tp1;3] der genomischen *mega* Region auf dem dritten Chromosom. Beim **Allelitätstest** überleben im Verhältnis zu den heterozygoten Weibchen (G0012/FM7c oder G0044/FM7c) tatsächlich nur halb so viel (etwa 50%) der transheterozygoten Weibchen (*mega*^{EA97}/ G0012 oder *mega*^{EA97} /G0044). Bei der **Positivkontrolle** überleben ebenfalls, wie erwartet, nur 50% der homozygoten Weibchen von G0012 bzw. G0044, weil sie eine *mega* Duplikation besitzen und 100% der heterozygoten Balancer-Chromosomen-Weibchen. Bei der **Negativkontrolle**, die entweder G0012 oder G0044 kombiniert mit einer P-Insertion (G0162) auf dem Chromosomenabschnitt 15C4 besitzt, überleben jedoch ähnlich viele transheterozygote Weibchen (G0012/G0162 oder G0044/G0162), wie heterozygote Weibchen.

Der Allelitätstest zeigt, dass *mega*^{G012} und *mega*^{G044} mit *mega*^{EA97} eine Komplementationsgruppe bilden, es überleben nur die 50% der transheterozygoten Weibchen, sie besitzen die *mega* Duplikation [Tp1;3] auf dem dritten Chromosom, bei den anderen 50% wirken sich die Mutationen letal aus. In Relation hierzu überleben etwa doppelt so viele heterozygote Weibchen (100%; *mega*^{G012}/FM7c und *mega*^{G044}/FM7c; Abb.4.1; siehe Tabelle.4.1, zu sehen ist der Allelitätstest mit *mega*^{EA97}, der Test mit *mega*^{VE896} erbringt vergleichbare Resultate, Daten nicht gezeigt.

Des weiteren wurden Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt. Die Positivkontrolle zeigt, dass 50% der homozygoten *mega*^{G012} und *mega*^{G044} Weibchen sterben, während die restlichen 50% wegen der *mega* Duplikation [Tp1;3] überleben (Abb.4.1; siehe Tabelle.4.1). Für die Negativkontrolle wurden transheterozygote Weibchen hergestellt, die ein *mega*^{G012} oder ein *mega*^{G044} P-Allel kombiniert mit einem *wurst*^{G0162} P-Allel besitzen (*mega*^{G012}/*wurst*^{G0162} oder *mega*^{G044}/*wurst*^{G0162}) Es überleben ähnlich viel transheterozygote, wie Balancer-Chromosomen-Weibchen (siehe Tabelle.4.1). Somit bilden *mega*^{G012} und *mega*^{G044} keine Komplementationsgruppe mit *wurst*^{G0162}

Die Generierung transheterozygoter *mega* mutanter Embryonen, erfolgt in Anlehnung an das in Abb.4.1 beschriebene Protokoll, jedoch werden in der F1 Generation Df(1)sta/FM7-ftz statt der *mega*^{EA97} Weibchen mit *mega*^{G0012} [Tp1;3] mutanten Embryonen gekreuzt. Die Embryonen in der F2-Nachkommenschaft werden gesammelt (siehe 4.6.9) und fixiert (siehe 4.6.10). Bei Antikörperfärbungen können mutante Embryonen aufgrund des *ftz-lacZ* heterozygoter Geschwistertiere mit einer anti-β-GAL- und homozygot mutante Weibchen mit einer anti-SEX-LETHAL (SXL; Bopp et al., 1991) Antikörperfärbung identifiziert werden.

4.6.7 Reversionsanalyse von P-Elementintegrationsmutanten

Zur Remobilisierung der P-Elemente wird ein sogenanntes „jump-starter“-Chromosom (siehe 4.6.18; Bellen et al., 1989) eingekreuzt. Hierbei springt das P-Element mit Hilfe der Transposase aus, ohne dabei die Sequenz der umliegenden Gene zu verändern. In der Nachfolgeneration entstehen schließlich sogenannte revertante Fliegen. Während die P-Mutanten roten, halbmondförmigen Augen besitzen, sind die der Revertanten weiße und runde, so dass eine einfache Identifizierung der Tiere möglich ist. Es werden heterozygot X-chromosomal P-mutante Weibchen mit FM6-Männchen gekreuzt, die auf dem dritten Chromosom die stabile Transposase-Quelle P(ry⁺)Δ2-3,Sb tragen. In der F1-generation werden dann Jungfrauen, die das P-Element und das FM6 Balancer-Chromosom mit der Transposase-Quelle besitzen mit FM6-Männchen gekreuzt. In der F2-generation können

revertante Männchen aufgrund ihrer Augenform und Farbe identifiziert. Im Fall der *wurst* P-Insertionen, war es nur bei der *wurst*^{G0162} möglich Revertanten zu erzeugen.

4.6.8 Rettung *wurst* mutanter Phänotypen

Um die Letalität der *wurst*^{G0162} mutanten Männchen retten zu können (siehe 2.7.2), müssen heterozygote P-Weibchen hergestellt werden, die eine UAS-*wurst*-Linie auf dem zweiten Chromosom besitzen. Hierfür werden FM6; CyO/Sp (*Curly* und *Sternopleural*, als phänotypische Marker für das zweite Chromosom) Männchen, mit UAS-*wurst* tragenden Weibchen gekreuzt. Gleichzeitig müssen heterozygote P-Weibchen ebenfalls mit FM6;CyO/Sp Männchen gekreuzt werden. In der F1 Generation entstehen dann zum einen FM6;UAS-*wurst*/CyO Männchen und zum anderen heterozygote G0162;CyO/Sp Weibchen, die dann miteinander gekreuzt werden. In der F2-Nachkommenschaft werden dann heterozygote P-Weibchen (G0162;CyO/UAS-*wurst*) und FM6;CyO/UAS-*wurst* Männchen herausgesucht und verkreuzt, so dass man einen stabilen Stock mit G0162/FM6;CyO/UAS-*wurst* heterozygoten Weibchen erhält. Diese Weibchen werden dann mit FM6 Männchen, die die Treiberlinien *armadillo*-GAL4, *actin*-GAL4, 69B-GAL4 oder *btl*-GAL4 tragen, gekreuzt. In der hierauf folgenden Generation entstehen *wurst* mutante Männchen, die gleichzeitig UAS-*wurst* und eine GAL4-Treiberlinie besitzen. Da *wurst* mutanten Männchen normalerweise letal sind, ist so durch eine gezielte *wurst* Überexpression eine Rettung der Letalität möglich (Abb.2.26). Die jetzt überlebenden *wurst* mutanten Männchen sind aufgrund des P-Elements anhand ihrer roten Augenfarbe und der runden Augenform (P-Marker: *mini-white*; Bar) zu identifizieren.

Pa:	<i>wurst</i> ^{G0162} /FM7c	X	FM6/FM6; CyO/Sp
Pb:	<i>x/y</i> ;UAS- <i>wurst</i> /UAS- <i>wurst</i>	X	FM6/FM6; CyO/Sp
F1:	<i>wurst</i> ^{G0162} /FM6; CyO/Sp	X	FM6/y;CyO/UAS- <i>wurst</i>
F2:	<i>wurst</i> ^{G0162} /FM6; CyO/UAS- <i>wurst</i>	X	FM6/y;CyO/UAS- <i>wurst</i>
F3:	<i>wurst</i> ^{G0162} /FM6; UAS- <i>wurst</i> /UAS- <i>wurst</i>	X	FM6/y; <i>actin</i> -GAL4/CyO

Um den Gasfüllungsphänotyp retten zu können müssen heterozygote *wurst*^{G0162}/FM7i-*aktin*-GFP;UAS-*wurst*/UAS-*wurst* Weibchen erzeugt und mit FM7i-*aktin*-GFP Männchen, die die *btl*-GAL4 Treiberlinie besitzen, gekreuzt werden. Die *wurst*^{G0162} mutanten Männchen, die keine GFP-Fluoreszenz besitzen und daher von allen anderen Embryonen zu unterschieden sind, werden dechorioniert (siehe 4.6.10), auf einen Objektträger gelegt, mit Voltalev-Öl bedeckt und anschließend unter dem Lichtmikroskop beobachtet.

<i>wurst</i> ^{G0162} /FM6;UAS- <i>wurst</i> /UAS- <i>wurst</i>	X	FM7i- <i>aktin</i> -GFP/y;UAS- <i>wurst</i> /UAS- <i>wurst</i>
<i>wurst</i> ^{G0162} /FM7i- <i>aktin</i> -GFP;UAS- <i>wurst</i> /UAS- <i>wurst</i>	X	FM7i- <i>aktin</i> -GFP/y; <i>btl</i> -GAL4/ <i>btl</i> -GAL4

4.6.9 Sammeln von Embryonen

Zum Sammeln von Embryonen werden die Fliegen in einen Becher mit einer Apfelsaftagarplatten, die mit Hefe bestrichen sind, gesetzt. Nach verschiedenen Entwicklungszeiten werden die Embryonen gesammelt und gründlich mit Wasser gewaschen.

4.6.10 Fixierung von Embryonen

Die gewaschenen Embryonen werden für 3min in einer Hypochloridlösung (50% Klorix) dechorioniert, dann mit Wasser gewaschen. Anschließend werden sie in ein Glasszintillationsgefäß mit 6ml Heptan und 1ml Fixierlösung überführt, 20min geschüttelt, 10ml Methanol zugegeben und erneut 2min geschüttelt. Danach werden die Embryonen in Methanol gewaschen und aufgenommen und bei -20°C gelagert.

4.6.11 *In situ*-Hybridisierung mit antisense-RNA an Embryo-Totalpräparaten

Diese Methode beruht auf der *in situ*-Hybridisierung und Detektion Digoxigenin- markierter DNA-Proben an mRNA in Totalpräparation von Embryonen nach Tautz und Pfeifle (1989).

A.) Vorbehandlung der Embryonen

Fixierten Embryonen (siehe 4.6.10) werden mit 1ml Methanol gespült und anschließend mit 500µl Methanol und 500µl PBT gewaschen. Die Nachfixierung erfolgt mit 500µl PBT und 500µl Fixierlösung für 20min auf dem Drehrad. Danach wird die Fixierlösung durch mehrmaliges Waschen mit PBT entfernt. Es erfolgt eine 1,5minütige ProteinaseK-Behandlung mit 10µl nicht vorverdauter ProteinaseK (50µg/ml), das durch viermaliges Reinigen mit PBT von den Embryonen entfernt wird.

B.) Hybridisierung und Waschen der Embryonen

Nach der ProteinaseK-Behandlung überführt man die Embryonen in 250µl PBT mit 250µl Hybridisierungslösung3, danach in 250µl Hybridisierungslösung3 und letztendlich in 250µl Hybridisierungslösung2. Die Embryonen werden dann 20min. bei 65°C im Wasserbad mit 250µl Hybridisierungslösung2 prähybridisiert. Nach Entfernen des Überstandes wird die DIG-markierten antisense-RNA-Probe in 30 µl Hybridisierungslösung2 zugegeben, gemischt und ü.N. bei 65°C hybridisiert. Am nächsten Tag wird ungebundene überschüssige Probe durch Spülen mit Hybridisierungslösung2 und 2x mit Hybridisierungslösung3 bei 65°C entfernt. Anschließend wird mit PBT umgepuffert.

C.) Signaldetektion mit alkalischer Phosphatase

Das nun DIG-markierte RNA-Hybrid wird durch 1h Inkubation von einem präabsorbierten anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase-Antikörper-Konjugat (1:2000) spezifisch gebunden. Überschüssiger und unspezifisch gebundener Antikörper wird durch Waschen mit PBT entfernt. Danach wird 3x 5min in 1ml Alkalische-Phosphatase-Puffer (AP-Puffer) inkubiert. Nach dem letzten Inkubationsschritt überführt man die Embryonen auf Glasschälchen, und startet die Färberreaktion durch die Zugabe von 4,5µl NBT und 3,5µl X-Phosphat (beides Boehringer: „DNA-Labeling and Detektion Kit-Nonradioaktiv“). Zur Beendigung der Färbung werden die Embryonen in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit PBT gewaschen.

D.) Signaldetektion mit TSA

Nach der Hybridisierung und Umpufferung mit PBT werden die Embryonen mit präabsorbierten anti-Digoxigenin-Antikörper (1:500) 1Std. bei RT behandelt. Anschließend wird Überschüssiger und unspezifisch gebundener Antikörper durch 4x 10minütiges Waschen (PBT) entfernt. Hiernach erfolgt für 1Std. ein Antikörperreaktion mit einem präabsorbierten anti-Schaf-Biotin-Antikörper-Konjugat (1:500) bei RT und wiederholtes waschen mit PBT. Mit Hilfe der AB-Lösung (Vectastain ABC-Elite-Kit, siehe 4.6.12) wird das Signal bei RT und 45min Inkubation verstärkt. Hiernach vervollständigen 4maliges Waschen mit PBT, eine 20minütige Zugabe von TSA-Cyanine3 (Tyramid-System-Amplifier; NEN, Boston; 1:75 Mix mit der Verstärkerlösung, lichtgeschützt) und 6maliges Waschen mit PBT die Färbereaktion.

4.6.12 Antikörperfärbung an Embryo-Totalpräparaten**Nichtmaschinelle Antikörperfärbung**

Die fixierten Embryonen werden 3x 10min mit je 1ml BBT gewaschen und dann ü. N. mit 200µl primärer Antikörper-Lösung inkubiert (Drehrad, 4°C). Am nächsten Tag erfolgte ein 20min Waschschrift mit 1ml BBT und zwei weitere 20min Inkubationen mit je 0,5ml 3% Ziegenerum in BBT. Im nächsten Schritt erfolgt die zweistündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (präabsorbiert in BBT inkl. 3% Ziegenerum verdünnt) und sorgfältiges Waschen mit PBT.

A.) Peroxidase gekoppelte sekundäre Antikörper:

Ein Komplex aus Avidin/biotinylierter Meerrettich-Peroxidase wird in einer 30minütigen Inkubation von Avidin DH und biotinylierter Meerrettich-Peroxidase (beides sind Bestandteile des Vectastain-ABC-Kits; Vector-Laboratories Burlingame, USA) gebildet und für 45min bei

RT zu den Embryonen gegeben. Nichtgebundenen Komplexe werden, bevor die eigentliche Färbereaktion beginnt, mit PBT entfernt:

für die Färbung mischt man jeweils eine Tablette Peroxidase und DAB (Sigma Fast) in 1ml Wasser (dest.), entnimmt 150µl und gibt es zu den Embryonen, die in einem Färbeschälchen mit 700µl PBT liegen. Nach der Färbereaktion werden die Embryonen mit PBT gewaschen.

für eine TSA-Fluoreszenzfärbung werden die Embryonen lichtgeschützt mit einem 200µl Mix (1:75) aus TSA-Cyanine3 und der Verstärkerlösung für 20min inkubiert. Anschließend müssen die Embryonen sorgfältig gewaschen werden (6x 5min).

B.) Alkalische Phosphatase gekoppelte sekundäre Antikörper:

Für die alkalische Phosphatasereaktion werden die Embryonen in 500µl AP-Puffer in Färbeschälchen transferiert und durch Zugabe von 4,5µl NBT und 3,5µl X-Phosphat (Boehringer-Kit) wird die Färbereaktion gestartet. Die durch mehrmaliges Waschen mit PBT gestoppt wird.

C.) Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte sekundäre Antikörper

Nach dem Auswaschen des primären Antikörpers, werden das entsprechende präabsorbierte Alexa-Fluor®-Antikörper-Konjugat (Molecular Probes) zu lichtgeschützten Embryonen zugegeben. Die Inkubation erfolgt 2Std. bei RT mit dem Drehrad. Anschließend wird der sekundäre Antikörper durch mehrmaliges Waschen mit PBT (5x 5min) entfernt.

Maschinelle Antikörperfärbung

Für die maschinelle Antikörperfärbung wurde die computergesteuerte Färbemaschine „*in situ* pro“ der Firma Abimed/Intavis (Köln) genutzt. Hierfür wurde von mir ein spezielles Programm entwickelt, dass es erlaubt die Antikörperfärbungen, mit Ausnahme der Färbereaktionen, von der Maschine durchführen zu lassen. Hierbei werden 50µl Embryonen mit 100µl BBT in ein Reaktionsgefäß der Fa. Intavis überführt. Die Reaktionsgefäße werden mit einem Deckel verschlossen und in einen Metallblock (96 Steckplätze) in der Maschine überführt. Der am unteren Ende der Gefäße befindliche Lösungstopper wird gegen eine Metalnadel ausgetauscht, um einen Lösungsdurchfluss gewährleistet zu können. Das Reaktionsgefäß besitzt außerdem eine Fritte, die verhindert, dass die Embryonen bei einem Lösungsdurchfluss mit ausgespült werden. Das Programm ist so konstruiert, dass der gesamte maschinelle Ablauf ü.N. erfolgen kann. Dabei beträgt die Wartezeit pro Waschschrift 4min, der primäre Antikörper wird 6Std. und der sekundäre Antikörper 5Std. inkubiert. Die Zeit für das Ausblasen der Lösung beträgt konstant 4sec. In die Reaktionsgefäße werden immer 200µl. Lösung injiziert. Der Ablauf der Antikörperbehandlung ist in einzelnen Schritten in der Tabelle 4.2 aufgelistet.

Lösung	Anzahl der Injektionen	Inkubationszeit/Schritt
BBT	6x	a 4min
1. Antikörper	1x	6Std.
BBT	6x	a 4min
BBT+ Serum	4x	a 4min
2. Antikörper	1x	5Std.
PBT	6x	a 4min
A,B Reaktionslösung	1x	2Std.
PBT	6x	a 4min

Tabelle.4.2: Maschinelle Antikörperfärbung. Wasch- und Inkubationsschritte, die notwendig für eine maschinelle Antikörperfärbung an Embryo Totalpräparaten sind. Nach dem Ablauf des Programms mit der Computer-gesteuerten Maschine „*in situ pro*“ der Firma Abimed/Intavis (Köln), wurde an den Embryonen eine entsprechende Färbereaktion eingeleitet.

Einbettung der Embryonen auf Objektträgern

Für die Lichtmikroskopie wurden die Embryonen mit Hilfe von Glycerol und für inverse konfokale Mikroskopie mittels Vectashield® (Vector Laboratories) auf dem Objektträger mit einer Nadel verteilt.

4.6.13 Texas-Red®-dextran-Injektion in Embryonen

Für die Injektion werden die Embryonen dechorioniert (siehe 4.6.10) und auf einer Apfelsaftagarplatte aufgereiht. Die Embryonen werden anschließend mit Hilfe eines Heptan-Klebers auf einen Objektträger überführt und mit Voltalev-Öl bedeckt werden. Die Injektion erfolgt mit einem Transjector 5246 (Eppendorf) und sterilen Femtotips-II-Nadeln (Gold, Eppendorf), wobei die für die Injektion benötigte Zeit und der Druck variieren dürfen. Die Nadel wird vor der Benutzung mit 20µl des 10kDa großem Texas-Red®-dextrans (Molecular Probes; D-1828) gefüllt. Unmittelbar nach der Injektion werden die Embryonen mit einem LSM (siehe 4.6.14) betrachtet. Zur Injektion wird das Texas-Red®-dextran in 1ml PBT (pH 7,5) aufgenommen, auf 50°C erwärmt und stark geschüttelt (Vortex), um eine homogene Lösung zu erhalten. Diese Lösung wird dann 15min bei 15000Upm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, 1:5 mit Wasser (dest.) verdünnt und mit einer Millipore Centriprep Säule (für 10kDa) aufgereinigt. Texas-Red®-dextran muss lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt werden.

4.6.14 Arbeiten mit dem Zeiss-Axiophot-Mikroskop

Gefärbte Embryototalpräparate aus Antikörperfärbungen oder *in situ*-Hybridisierungsexperimenten wurden unter einem Zeiss-Axiophot-Lichtmikroskop mit einer Kontron Kamera

oder an einem Zeiss-Axiovert 410 „Laser scanning microscope (LSM) photographiert. Dabei wurden Embryonen in Übersicht mit einem 20x Objektiv und einem 10x Okular also in 200facher Vergrößerung bzw. Detailaufnahmen mit einem 40x Objektiv, also bei 400x Vergrößerung aufgenommen. Die Aufnahmen lagen mit Ausnahme bei den Gasfüllungsexperimente immer in elektronischer Form vor und wurden im weiteren Verlauf mit Hilfe von Photoshop 5 (Adobe) bearbeitet. Für die Gasfüllungsexperimente wurden Embryonen und Larven am Zeiss-Axiophot-Mikroskop mit Hilfe einer Agfa Kamera und einem Agfa Kunstlichtfilm aufgenommen. Anschließend entwickelte Fotos wurden mit einem „Scanner“ (Agfa e25) in elektronische Daten umgewandelt und mit Photoshop 5 bearbeitet.

4.6.15 Elektronenmikroskopie

Die Embryonen (Anfang st17) müssen dechorioniert (siehe 4.6.10) und anschließend devitellinisiert werden. Für letzteres reiht man die Embryonen auf einem Apfelsaftagarstück auf, fixiert sie dann über ein Heptan-Kleber-Gemisch an ein Objektgläschen und gibt PBT hinzu, damit sie nicht austrocknen. Mit einer spitzen Glasnadel kann die Vitellinmembran vom Embryo gelöst werden. Die Fixierung der Embryonen erfolgt 10min bei RT mit 2,5% Glutaraldehyd in 0,1M Cocadylatpuffer (pH 7.4) und ü.N. mit 2% Glutaraldehyd bei 4°C. Zur besseren Erhaltung der Membranen schneidet man die Embryonen zur Fixierung in der Mitte durch. Danach folgt eine Fixierung mit 1% Osmiumtetroxid, eine Färbung mit 1% Tanninsäure und 1% Uranylsäure. Schließlich werden die Embryonen dehydriert und mit Agar100 eingebettet. Zur elektronenmikroskopischen Betrachtung müssen dünne Schnitte (30-40nm) angefertigt und mit Uranylacetat gegengefärbt werden. Zur Analyse der Schnitte wird das PhillipsCM120 BioTwin Elektronenmikroskop (Phillips) und eine CCD Kamera (GATAN) benutzt. Die Einbettung der Embryonen, das Schneiden dünner Präparate und eine Hilfestellung bei der Analyse der Präparate am Mikroskop ist freundlicherweise von D. Riedel übernommen worden.

4.6.16 Bestimmung von DH- und Tracheenzelllängen

Zur Feststellung der Länge eines DHs, werden die elektronischen Daten von embryonalen Antikörperfärbungen in das CAD Programm ArchiCad6,5 (Graphisoft) überführt. Zuerst wird die tatsächliche Länge bestimmt, indem man mehrere Linien dem gewundenen Verlauf eines DHs anpasst. Die Summe der Länge aller Linien ergibt die tatsächliche DH Länge. Um natürliche Größenunterschiede zwischen den Embryonen auszugleichen wurde die Länge des Tracheensystems mit Hilfe einer geraden Linie, die sich vom anterioren zum posterioren Ende eines DHs erstreckt, ermittelt. Die Differenz aus tatsächlicher DH Länge und der

Geraden, zeigt, wie stark sich ein DH beugt. Statistische Berechnungen wurden mit Excel5 durchgeführt. Die Länge der Tracheenzellen wurde ebenfalls mit ArchiCAD6,5 ermittelt. Statistische Auswertungen wurden mit Excel5 durchgeführt.

4.6.17 Liste der benutzten Antikörper

Antikörper	Verdünnung, Herkunft, Verwendung	Referenz; Hersteller
anti-ARMADILLO (7A1)	1:5; Maus, ZA-Marker	Riggleman et al., 1990; DSHB
anti-BAZOOKA	1:500; Kaninchen; MZ-Marker	Wodarz et al., 1999; Knust
anti-CORACLE	1:2000; Meerschweinchen; SJ-Marker	Fehon et al., 1994; Fehon
anti-CRUMBS (Cq4)	1:10; Maus; MZ-Marker	Tepass et al., 1990; DSHB
anti-DISCS-LARGE	1:500, Kaninchen; SJ-Marker	Woods und Bryant, 1990; Bryant
anti-Dig	1:500, Schaf	Roche
anti-Dig-AP	1:500, Pferd; AP gekoppelt	Roche
anti-FASCICLIN3 (7G10)	1:10; Maus; SJ-Marker	Patel et al., 1987; DSHB
anti- β -GALACTOSIDASE	1:500; Maus oder Kaninchen	Promega; Cappel, ICN
anti-Kaninchen Biotin/AP	1:500; Pferd; Biotin oder AP gekoppelt	Vector Laboratories
anti-Maus Biotin/AP	1:500; Pferd; Biotin oder Ap gekoppelt	Vector Laboratories
anti-MEGATRACHEA	1:25; Kaninchen, SJ-Marker	diese Arbeit
anti-MEGATRACHEA	1:30; Meerschweinchen; SJ-Marker	diese Arbeit
anti-NEUREXIN	1:500; Kaninchen; SJ-Marker	Baumgartner et al., 1996; Bellen
anti-DmPAR-6	1:500; Kaninchen; MZ-Marker	Petronczki et al., 2001; Knoblich
anti-Schaf-Biotin	1:500, Esel	Jackson Immuno, Dianova
anti- α -SPECTRIN (3A9)	1:5; Maus; Zellmembran-Marker	Dubreuil et al., 1987; DSHB
anti-SEX-LETHAL (M18)	1:5, Maus, Geschlechtsmarker	Bopp et al., 1991; DSHB
2A12	1:4; Maus; Tracheenlumen	Manning und Krasnow, 1993; DSHB

Tabelle.4.3: Die Tabelle zeigt eine Auflistung der Antikörper, die für diese Arbeit benutzt wurden. In der linken Spalte stehen die einzelnen Antikörper. In der mittleren Reihe ist die benutzte Konzentration, aus welchen Tier sie gewonnen wurden und ihre Verwendung beschrieben. In der rechten Spalte sind Originalarbeiten aufgeführt und aus welchen Labor (in Fettdruck) die Antikörper stammen. Für Fluoreszenzfärbungen wurden von Molecular Probes Alexa-Fluor®-Antikörper-Konjugate (488, 543nm) gegen Kaninchen, Maus und Meerschweinchen benutzt.

4.6.18 Auflistung der verwendeten Fliegenlinien

Name	Verwendung	Quelle	Referenz
bulbous ^{k1012b}	Tracheenmorphologie	Bloomington	Beitel und Krasnow, 2000
convoluted ^{k06507b}	Tracheenmorphologie	T. Laverty	Beitel und Krasnow, 2000
coracle ⁵	Zerstörung der SJs	R. G. Fehon	Ward et al., 1998
cystic ^{k13717b}	Tracheenmorphologie	T. Laverty	Beitel und Krasnow, 2000
Df(1)D15	wurst Defizienz	Bloomington	Watson et al., 1991
fasciclin3 ^{E25}	SJ Bildung	Bloomington	Withlock, 1993
mega ^{EA97} (pickel ^{EA97}) hypomorph	epitheliale Barriere Tracheenmorphologie	G. J. Beitel	Perrimon et al., 1989 Beitel und Krasnow, 2000
mega ^{VE896} (pickel ^{VE896}) hypomorph	epitheliale Barriere Tracheenmorphologie	Bloomington	Perrimon et al., 1989 Beitel und Krasnow, 2000
mega ^{IVE896} , P(FRT) ¹⁰¹	Zur Herstellung maternal zygotischer Mutanten	diese Arbeit	diese Arbeit
mega ^{l(1)G0012} Nullallel	Zerstörung der SJs, epitheliale Barriere, Tracheenmorphologie	U. Schäfer	Peter et al., 2002
mega ^{l(1)G0012} ; btl- GAL4	Aktin-, Mikrotubuli- Zytoskelettfärbungen	diese Arbeit	diese Arbeit
mega ^{l(1)G0012} , P(FRT) ¹⁰¹ /FM7c-ftz lacZ	Zur Herstellung maternal zygotischer Mutanten	diese Arbeit	diese Arbeit
mega ^{l(1)G0044} Nullallel	epitheliale Barriere Tracheenmorphologie	U. Schäfer	Peter et al., 2002
neurexin ⁴³⁰⁴	Zerstörung der SJs	Bloomington	Baumgartner et al., 1996
sinuous ⁰⁶⁵²⁴	Tracheenmorphologie	Bloomington	Beitel und Krasnow, 2000
Df(1)sta;Tp(1;3)sta:s s(sta)	für mega Defizienz; zu Df(1)sta	Bloomington	Mazina et al., 1991
varicose ^{03953b}	Tracheenmorphologie	Bloomington	Beitel und Krasnow, 2000
wurst ^{G0162}	Tracheenmorphologie	U. Schäfer	Peter et al., 2002
wurst ^{G0328}	Tracheenmorphologie	U. Schäfer	Peter et al., 2002
wurst ^{(1)G0162} ; UAS- wurst	Rettungsexperimente	diese Arbeit	diese Arbeit
1-eve-1	Tracheenzellmarker	Bloomington	Perrimon et al., 1991

Balancer-Chromosom und UAS-GAL4-Linien:			
Name	Verwendung	Quelle	Referenz
Sp/CyO;Dr/TM3,ftzB	Balancer-Chromosom	Bloomington	Lindsley und Zimm, 1992
FM6	Balancer-Chromosom	Bloomington	Lindsley und Zimm, 1992
FM6; CyO/Sp	Balancer-Chromosom	Bloomington	Lindsley und Zimm, 1992
FM6; P(ry ⁺)Δ2-3,Sb	stabile Transposase	U.Schäfer	Peter et al., 2002
FM7c-P(<i>ftz-lacZ</i>)	X- Balancer-Chromosom	Bloomington	Lindsley und Zimm, 1992
FM7i-P(<i>actin-GFP</i>)	X- Balancer-Chromosom	Bloomington	Reichert und Ferrandon, 1998
P{FRT(w[hs])}101	FRT ¹⁰¹	Bloomington	Chou und Perrimon, 1992
P{FRT(w[hs])}101(P{hsFLP}38	FRT ¹⁰¹ ,FLP,ovo ^{D1}	Bloomington	Chou und Perrimon, 1992
P(<i>actin5c</i>)-GAL4	ubiquitärer Treiber	Bloomington	Ito et al., 1997
P(<i>armadillo</i>)-GAL4	ubiquitärer Treiber	Bloomington	Sanson et al., 1996
P(<i>breathless</i>)-GAL4	Treiber Tracheensystem	R. Schuh	Shiga et al., 1996
<i>G455-GAL4</i>	Treiber Hinterdarm	M. Hoch	nicht publiziert
P(69B)-GAL4	Treiber Ektoderm	Bloomington	Staehling-Hampton, 1994
<i>UAS-actin-GFP</i>	Aktinzytoskelett	R. Schuh	Brand, 1999
<i>y,w;UAS-mega/CyO</i>	P-Vektorintegration mit <i>mega</i> cDNA LD32916	diese Arbeit	diese Arbeit
<i>UAS-nod-lacZ</i>	Mikrotubuli Minus Ende	I.E. Clark	Clark et al., 1997
<i>UAS-tau-myc-GFP</i>	Mikrotubuli Erkennung	R. Schuh	Brand, 1999
<i>y,w;UAS-wurst-/CyO</i>	P-Vektorintegration mit <i>wurst</i> cDNA LD21896	diese Arbeit	diese Arbeit

Tabelle.4.4: Auflistung der verwendeten Fliegenlinien. In der linken Reihe ist die Bezeichnung der jeweiligen Fliegenlinie und in der zweiten Spalte von links der Verwendungszweck in dieser Arbeit zu sehen. In der zweiten Reihe von rechts ist die Bezugsquelle und in der rechten Spalte die Originalreferenz angegeben.

5 Literaturverzeichnis

Adams, M.D., et al. (2000). The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 287, 2185-2195.

Affolter, M., und Shilo, B.Z. (2000). Genetic control of branching morphogenesis during *Drosophila* tracheal development. Curr. Opin. Cell Biol. 12, 731-573.

Altschul, S.F. (1991). Amino acid substitution matrices from an information theoretic perspective. J. Mol. Biol. 29, 555-565.

Anderson, M.G., Perkins, G.L., Chittick, P., Shrigley, R.J. und Johnson, W.A. (1995). *drifter*, a *Drosophila* POU-domain transcription factor, is required for the correct differentiation and migration of tracheal cells and midline glia. Genes Dev. 9, 123-137.

Ashburner, M. (1989). *Drosophila: A Laboratory Handbook and Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Aschenbrenner, S., und Walz, B. (1998). Pleated septate junctions in leech photoreceptors: ultrastructure, arrangement of septa, gate and fence functions. Cell Tissue Res. 1998, 253-269.

Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F., und Knust, E. (2001). *Drosophila* Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity. Nature 414, 638-643.

Bhat, M.A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K.O., Choi, K.W., und Bellen, H.J. (1999). Discs Lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity. Cell 96, 833-845.

Baum, B., und Perrimon, N. (2001). Spatial control of the actin cytoskeleton in *Drosophila* epithelial cells. Nature Cell. Biol. 3, 883-890.

Baumgartner, S., Littleton, J.T., Broadie, K., Bhat, M.A., Harbecke, R., Lengyel, J.A., Chiquet-Ehrismann, R., Prokop, A., und Bellen, H.J. (1996). A *Drosophila* *neurexin* is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function. Cell 87, 1059-1068.

- Behr, M. (1999). Analyse der Entwicklung des embryonalen Tracheensystems von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit. Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Abteilung Molekulare Entwicklungsbiologie. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- Beitel, G.J., und Krasnow, M.A. (2000). Genetic control of epithelial tube size in the *Drosophila* tracheal system. *Development* 127, 3271-3282.
- Bilder, D., Li, M., und Perrimon, N. (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* 289, 113-116.
- Bilder, D., und Perrimon, N. (2000). Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* 403, 676-680.
- Bilder, D., Schober, M., und Perrimon, N. (2003). Integrated activity of PDZ protein complexes regulates epithelial polarity. *Nature Cell Biol.* 5, 53-58.
- Bellen, H.J., O`Kane, C.J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Pearson, R.K., und Gehring, W.J. (1989). P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes Dev.* 3, 1288-1300.
- Blom, N., Gammeltoft, S., und Brunak, S. (1999). Sequence and Structure-based Prediction of Eukaryotic Protein Phosphorylation Sites. *J. Mol. Biol.* 294, 1351-1362.
- Boube, M., Martin-Bermudo, M.D., Brown, N.H. und Casanova, J. (2001). Specific tracheal migration is mediated by complementary expression of cell surface proteins. *Genes Dev.* 15, 1554-1562.
- Boube, M., Llimargas, M., und Casanova, J. (2000). Cross-regulatory interactions among tracheal genes support co-operative model for the induction of tracheal fates in the *Drosophila* embryo. *Mech. Dev.* 91, 271-287.
- Brand, A. (1999). GFP as a cell developmental marker in the *Drosophila* nervous system. *Meth. Cell Biol.* 58, 165–181.
- Brand, A.H., und Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.

- Campos-Ortega, J.A., und Hartenstein, V. (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. (Berlin: Springer).
- Chapman, R.F. (1982). The Insects. Structure and function. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Chen, C.-K., Kühnlein, R.P., Eulenberg, K.G., Vincent, S., Affolter, M., und Schuh, R. (1998). The transcription factors KNIRPS and KNIRPS RELATED control cell migration and branch morphogenesis during *Drosophila* tracheal development. *Development* 125, 4959-4968.
- Chihara, T., und Hayashi, S. (2000). Control of tracheal tubulogenesis by Wingless signaling. *Development* 127, 4433-4442.
- Chou, T. B., und Perrimon, N. (1992). Use of a yeast site-specific recombinase to produce female germline chimeras in *Drosophila*. *Genetics* 131, 643-653.
- Clark, I.E., Jan, L.Y., und Jan, Y.N. (1997). Reciprocal localization of Nod and kinesin fusion proteins indicates microtubule polarity in the *Drosophila* oocyte, epithelium, neuron and muscle. *Development* 124, 461-470.
- Cohen, S. (1993). Imaginal disc development. Aus Bate, M. und Martinez Ariaz, A. (eds.). The development of *Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 747-841.
- Cox, R.T., Kirkpatrick, C., und Peifer, M. (1996). Armadillo is required for adherens junction assembly, cell polarity, and morphogenesis during *Drosophila* embryogenesis. *J. Cell Biol.* 134, 133-148.
- de Celis, J.F., Llimargas, M., und Casanova, J. (1995). *ventral veinless*, the gene encoding the Cf1a transcription factor, links positional information and cell differentiation during embryonic and imaginal development in *Drosophila melanogaster*. *Development* 121, 3405-3416.
- Dubreuil, R.R., Maddux, P.B., Grushko, T.A., und MacVicar, G.R. (1997). Segregation of two spectrin isoforms: polarized membrane-binding sites direct polarized membrane skeleton assembly. *Mol. Biol. Cell* 8, 1933-1942.

- Eulenberg, K.G., und Schuh, R. (1997). The *tracheae defective* gene encodes a bZIP protein that controls tracheal cell movement during *Drosophila* embryogenesis. *EMBO J.* 16, 7156-7165.
- Fehon, R.G., Dawson, I.A., und Artavanis-Tsakonas, S. (1994). A *Drosophila* homologue of membrane-skeleton protein 4.1 is associated with septate junctions and is encoded by the *coracle* gene. *Development* 120, 545-557.
- Fink, A.L. (1999). Chaperone-Mediated Protein Folding. *PHYSIOLOGICAL REVIEWS* 79, 425-449.
- Fisk, G.J., und Thummel, C.S., (1998). The DHR78 Nuclear Receptor Is Required for Ecdysteroid Signaling during the Onset of *Drosophila* Metamorphosis. *Cell* 93, 543–555.
- Franch-Marro, X., und Casanova, J. (2000). The Alternative Migratory Pathways of the *Drosophila* Tracheal Cells Are Associated with Distinct Subsets of Mesodermal Cells. *Developmental Biology* 227, 80-90.
- Fullilove, S.L., und Jacobsen, A.G. (1978). Embryonic Development: Descriptive. In the genetics and biology of *Drosophila*. Academic Press, London, 106-227.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., und Tsukita, S. (1998a). Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* 141, 1539-1550.
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., und Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from *claudin-1*-deficient mice. *J. Cell Biol.* 156, 1099-1111.
- Furuse, M., Sasaki, H., Fujimoto, K., und Tsukita, S. (1998b). A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 143, 391-401.
- Furuse, M., Sasaki, H., und Tsukita, S. (1999). Manner of interaction of heterogeneous claudin species within and between tight junction strands. *J. Cell Biol.* 147, 891-903.

- Gabay, L., Seger, R., und Shilo, B.-Z. (1997). MAP kinase *in situ* activation atlas during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 124, 3535-3541.
- Glazer, L., und Shilo, B.-Z. (2001). Hedgehog signaling patterns the tracheal branches. *Development* 128, 1599-606.
- Gow, A., Southwood, C.M., Li, J.S., Pariali, M., Riordan, G.P., Brodie, S.E., Danias, J., Bronstein, J.M., Karchar, B., und Lazzarini, R.A. (1999). CNS myelin and Sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/Claudin-11* null mice. *Cell* 99, 649-659.
- Grawe, F., Wodarz, A., Lee, B., Knust, E., und Skaer, H. (1996). The *Drosophila* genes *crumbs* and *stardust* are involved in the biogenesis of adherens junctions. *Development* 122, 951-959.
- Greenspan, R. (1997). Fly pushing. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour.
- Gumbiner, B. M. (1992). Epithelial morphogenesis. *Cell* 69, 385-387.
- Hamazaki, Y., Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., und Tsukita, S. (2002). Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with Claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol. Chem.* 277, 455-61.
- Heiskala, M., Peterson, P.A., und Yang, Y. (2001). The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic* 2, 93-98.
- Hemphälä, J., Uv, A., Cantera, R., Bray, S., und Samakovlis, C. (2003). Grainy head controls apical membrane growth and tube elongation in response to Branchless/FGF signaling. *Development* 130, 249-258.
- Hogan, B.L., und Kolodziej, P.A. (2002). Organogenesis: molecular mechanisms of tubulogenesis. *Nature Rev. Genet.* 3, 513-523.
- Hoover, K.B., und Bryant, P.J. (2000). The genetics of the protein 4.1 family: organizers of the membrane and cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12, 229-234.

- Isaac, D.D., und Andrew, D.J. (1996). Tubulogenesis in *Drosophila*: a requirement for the *trachealess* gene product. *Genes Dev.* 10, 103-117.
- Ito, K., Awano, W., Suzuki, S., Hiromi, Y., und Yamamoto, D. (1997). The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 124, 761-771.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M., und Tsukita, S. (1999). Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of Claudins. *J Cell Biol.* 147, 1351-1363.
- Jarecki, J., Johnson, E., und Krasnow, M.A. (1999). Oxygen regulation of airway branching in *Drosophila* is mediated by Branchless FGF. *Cell* 99, 211-220.
- Jiang, R., Gao, B., Prasad, K., Greene, L.E., und Eisenberg, E (2000). Hsc70 chaperones clathrin and primes it to interact with vesicle membranes. *J. Biol. Chem.* 275, 8439-8447.
- Kazemi-Esfarjani, P., und Benzer, S. (2000). Genetic Suppression of Polyglutamine Toxicity in *Drosophila*. *Science* 287, 1837-1840.
- Kelly, W.L. (1998). The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *TIBS* 23, 222-227.
- Kiuchi-Saishin, Y., Gotoh, S., Furuse, M., Takasuga, A., Tano, Y., und Tsukita, S. (2002). Differential Expression Patterns of Claudins, Tight Junction membrane proteins, in Mouse Nephron Segments. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 875-886.
- Knust, E., und Bossinger, O. (2002). Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells. *Science* 298, 1955-1959.
- Kollmar, R., Nakamura, S.K., Kappler, J.A., und Hudspeth, A.J. (2001). Expression and phylogeny of claudins in vertebrate primordia. *PNAS* 98, 10196-10201.
- Krämer, H. (2000). The Ups and Downs of Life in an Epithelium. *J. Cell Biol.* 151, F15-F18.

- Kubota, K., Furuse, M., Sasaki, H., Sonoda, N., Fujita, K., Nagafuchi, A., und Tsukita, S. (1999). Ca^{2+} -independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions. *Curr. Biol.* 9, 1035-1038.
- Kuchinke, U., Grawe, F., und Knust, E. (1998). Control of spindle orientation in *Drosophila* by the Par-3-related PDZ-domain protein Bazooka. *Curr.Biol.* 8, 1357–1365.
- Kühnlein, R.P., und Schuh, R. (1996). Dual function of the region specific homeotic gene *spalt* during *Drosophila* tracheal system development. *Development* 122, 2215-2223.
- Lamb, R.S., Ward, R.E., Schweizer, L., und Fehon, R.G. (1998). *Drosophila* coracle, a member of the protein 4.1 superfamily, has essential structural functions in the septate junctions and developmental functions in embryonic and adult epithelial cells. *Mol. Biol. Cell* 9, 3505-3519.
- Lauf, U., Giepmans, B.N.G., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S.-C., und Falk, M.M. (2002). Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *PNAS* 99, 10446–10451.
- Lecuit, T., und Wieschaus, E. (2002). Junctions as Organizing Centers in Epithelial Cells ? A Fly Perspective. *Traffic* 3, 92-97.
- Lee, S., und Kolodziej, P.A. (2002). The plakin Short Stop and the RhoA GTPase are required for E-cadherin-dependent apical surface remodeling during tracheal tube fusion. *Development* 129, 1509-1520.
- Lemmon, S.K. (2001). Clathrin uncoating: Auxilin comes to life. *Curr. Biol.* 11, R49–R52.
- Lindsley, D.L., und Zimm, G.G. (1992). *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.
- Littleton, J.T., Bhat, M.A., und Bellen, H.J. (1997). Deciphering the function of *neurexins* at cellular junctions. *J. Cell Biol.* 137, 793-796.
- Llimargas, M. (2000). *wingless* and its signaling pathway have common and separable functions during tracheal development. *Development* 127, 4407-4417.

- Llimargas, M., und Casanova, J. (1997). *ventral veinless*, a POU domain transcription factor, regulates different transduction pathways required for tracheal branching in *Drosophila*. *Development* 124, 3273-3281.
- Lubarsky, B., und Krasnow, M.A. (2003). Tube morphogenesis: making and shaping biological tubes. *Cell* 112, 19-28.
- Manning, G., und Krasnow, M.A. (1993). Development of the *Drosophila* tracheal system. In *The Development of Drosophila melanogaster*, M. Bate and A. Martinez Arias, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Harbor, 609-685.
- Marchler, G., und Wu, C. (2001). Modulation of *Drosophila* heat shock transcription factor activity by the molecular chaperone DROJ1. *EMBO J.* 20, 449-509.
- Mazina, O.M., Belyaeva, E.S., und Zhimulev, I.F. (1991). Cytogenetical analysis of the 2B3-4-2B11 region of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. VII. influence of the *ecs* locus on female fertility. *Mol. Gen. Genet.* 225, 99-105.
- Metzger, R.J., und Krasnow, M.A. (1999). Genetic control of branching morphogenesis. *Science* 284, 1635-1639.
- Mitic, L., Vanitallie, C.M., und Anderson, J. (2000). Molecular Physiology and Pathology of Tight Junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279, G250–G254.
- Möller, S., Croning, M. D. R., und Apweiler R. (2001). Evaluation of methods for prediction of membrane spanning regions. *Bioinformatics* 17, 646-653.
- Morita, K., Furuse, M., Fujimoto, K., und Tsukita, S. (1999a). Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *PNAS* 96, 511-516.
- Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M., und Tsukita, S. (1999b). Endothelial Claudin: Claudin-5/TMVCFC Constitutes Tight Junction Strands in Endothelial Cells. *J. Cell Biol.* 147, 185–194.
- Müller, H.A. (2000). Genetic control of epithelial cell polarity: lessons from *Drosophila*. *Dev. Dyn.* 218, 52-67.

Müller, H.A. (2003). Epithelia polarity in flies: more than just Crumbs. *Dev. Cell* 4, 1-9.

Müller, H.A., und Wieschaus, E. (1996). *armadillo*, *bazooka*, and *stardust* are critical for early stages in formation of the zonula adherens and maintenance of the polarized blastoderm epithelium in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 134, 149-163.

Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunakan, S., und von Heijne, G. (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* 10, 1–6.

Niimi, T., Nagashima, K., Ward, J.M., Minoo, P., Zimonjic, D.B., Popescu, N.C., und Kimura, S. (2001). *claudin-18*, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing. *Mol. Cell Biol.* 21, 7380-7390.

Noirot-Timothee, C., und Noirot, C. (1980). Septate and scalariform junctions in arthropods. *Int. Rev. Cytol.* 63, 97–141.

Nüsslein-Volhard, C., und Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.

Oda, H., Uemura, T., Shiomi, T., Nagafuchi, A., Tsukita, S., und Takeichi, M. (1993). Identification of a *Drosophila* homologue of α -Catenin and its association with the Armadillo protein. *J. Cell Biol.* 121, 1133–1140.

Patel, N.H., Snow, P.M., und Goodman, C.S. (1987). Characterization and cloning of Fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* 48, 975-988.

Pellecchia, M., Szyperski, T., Wall, D., Georgopoulos, C., und Wüthrich, K. (1996). NMR Structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich Region of the *Escherichia coli* DnaJ Chaperone. *J. Mol. Biol.* 260, 236–250.

Perrimon N., Engstrom, L., und Mahowald, A.P. (1989). Zygotic lethals with specific maternal effect in *Drosophila melanogaster*. I. Loci on the X chromosome. *Genetics* 121, 333-352.

- Peter, A. et al. (2002). Mapping and identification of essential gene functions on the X chromosome of *Drosophila*. EMBO Rep. 3, 34-38.
- Petronczki, M., und Knoblich, J.A. (2001). DmPAR-6 directs epithelial polarity and asymmetric cell division of neuroblasts in *Drosophila*. Nature Cell Biol. 3, 43-49.
- Poliak, S., Maltis, S., Ullmer, C., Scherer, S., und Peles, E. (2002). Distinct claudins and associated PDZ proteins form different autotypic tight junctions in myelinating Schwann cells. J. Cell Bio. 159, 361-371.
- Ray, R.P., und Schüpbach, T. (1996). Intracellular signaling and the polarization of the body axes during *Drosophila* oogenesis. Genes Dev. 10, 1711-1723.
- Reichart, J.M., und Ferrandon, D. (1998) Technique Notes: Green balancers. Dros. Inform. Serv. 81, 201-202.
- Riggleman, B., Schedl, P., und Wieschaus, E. (1990). Spatial expression of the *Drosophila* segment polarity gene armadillo is posttranscriptionally regulated by wingless. Cell 63, 549-560.
- Roh, M.H., Liu, C. J., Laurinec, S., und Margolis, B. (2002). The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of Discs Lost to tight junctions. J. Biol. Chem. 277, 27501-27509.
- Samakovlis, C., Hacohen, N., Manning, G., Sutherland, D.C., Guillemin, K., und Krasnow, M.A. (1996). Development of the *Drosophila* tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events. *Development*, 122, 1395-1407.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sanonson, B., White, P., und Vincent, J.P. (1996). Uncoupling cadherin-based adhesion from *wingless* signaling in *Drosophila*. Nature 383, 627-630.
- Schneeberger, E.E., und Lynch, R.D. (1992). Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. Am. J. Physiol. 262, L647-661.

Schober, M., Schaefer, M., und Knoblich, J.A. (1999). Bazooka recruits Inscuteable to orient asymmetric cell divisions in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 402, 548-551.

Schulze, K.L., Broadie, K., Perin, M.S., und Bellen, H.J. (1995). Genetic and Electrophysiological Studies of *Drosophila* Syntaxin-1A Demonstrate Its Role in Nonneuronal Secretion and Neurotransmission. *Cell* 80, 311-320.

Seyffert, W., Gassen, H. G., Hess, O., Jäckle, H., Fischbach, K.-F. (1998). Lehrbuch der Genetik. GUSTAV FISCHER Verlag.

Simon, D.B., Lu, Y., Choate, K. A., Velazquez, H., Al-Sabban, E., Praga, M., Casari, G., Bettinelli, A., Colussi, G., Rodriguez-Soriano, J., McCredie, D., Milford, D., Sanjad, S., und Lifton, R.P. (1999). Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg²⁺ resorption. *Science* 285, 103-106.

Sheng, M., und Sala, C. (2001). PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Ann. Rev. Neurosci.* 24, 1-29.

Shiga, Y., Tanaka-Matakatsu, M., und Hayashi, S. (1996). A nuclear GFP/ beta-galactosidase fusion protein as a marker for morphogenesis in living *Drosophila*. *Dev. Growth Diffn.* 38, 99-106.

Snow, P.M., Bieber, A.J., und Goodman, C.S. (1989). Fasciclin III: A Novel Homophilic Adhesion Molecule in *Drosophila*. *Cell* 59, 313-323.

Songyang, Z., Fanning, A.S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S.M., Chishti, A.H., Crompton, A. Chan, A.C., Anderson, J.M., und Cantley, L.C. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. *Science* 275, 73-77.

Sonoda, N., Furuse, M., Sasaki, H., Yonemura, S., Katahira, J., Horiguchi, Y., und Tsukita, S. (1999). *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J. Cell Biol.* 147, 195-204.

Spiess, M. (1995). Heads or tails - what determines the orientation of proteins in the membrane. *FEBS Letters* 396, 76-79.

Staehling-Hampton, K., Hoffmann, F.M., Baylies, M.K., Rushton, E., und Bate, M. (1994). *dpp* induces mesodermal gene expression in *Drosophila*. *Nature* 372, 783-786.

Sutherland, D., Samakovlis, C., und Krasnow, M.A. (1996). *branchless* encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell*, 87 1091-1101.

Tanentzapf, G., und Tepass, U. (2003). Interactions between the *crumbs*, *lethal giant larvae* and *bazooka* pathways in epithelial polarization. *Nature Cell Biol.* 5, 46-52.

Tepass, U. (1996). Crumbs, a component of the apical membrane, is required for zonula adherens formation in primary epithelia of *Drosophila*. *Dev. Biol.* 177, 217-225.

Tepass, U., und Hartenstein, V. (1994). The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* 161, 563-596.

Tepass, U., und Knust, E. (1993). *crumbs* and *stardust* act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 159, 311-326.

Tepass, U., Theres, C., und Knust, E. (1990). *crumbs* encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* 61, 787-799.

Tepass, U., Tanentzapf, G., Ward, R., und Fehon, R.G. (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Ann. Rev. Genet.* 35, 747-784.

Tautz, D., und Pfeifle, C. (1989). A non -radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* 98, 81-85.

Thomas, G. H. (2001). Spectrin: the ghost in the machine. *BioEssays* 23, 152-160.

Tsukita, S., und Furuse, M. (2002). Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 531-536.

Tsukita, S., und Furuse, M. (1999). Occludin and Claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol.* 9, 268-73.

- Tsukita, S., Furuse, M., und Itoh, M. (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 285-293.
- Turner, F.R., und Mahowald, A.P. (1977). Scanning electron microscopy of *Drosophila melanogaster* embryogenesis. II. Gastrulation and segmentation. *Dev. Biol.* 57, 403-416.
- Uemura, T., Oda, H., Kraut, R., Hayashi, S., und Takeichi, M. (1996). Processes of dynamic epithelial cell rearrangement are the major targets of *cadE/shotgun* mutations in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 10, 659–671.
- Vincent, S., Ruberte, E., Grieder, N.C., Chen, C.-K., Haerry, T., Schuh, R., und Affolter, M. (1997). DPP controls tracheal cell migration along the dorsoventral body axis of the *Drosophila* embryo. *Development* 124, 2741-2750.
- Wappner, P., Gabay, L., und Shilo, B.-Z. (1997). Interactions between the EGF receptor und DPP pathways establish distinct cell fates in the tracheal placodes. *Development* 124, 4707-4716.
- Ward, R. E., Lamb, R. S., und Fehon, R.G. (1998). A conserved functional domain of *Drosophila coracle* is required for localization at the septate junction und has membrane-organizing activity. *J. Cell Biol.* 140, 1463-1473.
- Ward, R.E., Schweizer, L., Lamb, R.S., und Fehon, R.G. (2001). The protein 4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM) domain of *Drosophila* Coracle, a cytoplasmic component of the septate junction, provides functions essential for embryonic development und imaginal cell proliferation. *Genetics* 159, 219-228.
- Watson, K.L., Johnson, T.K., und Denell, R.E. (1991). Lethal(1) aberrant immune response mutations leading to melanotic tumor formation in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genet.* 12, 173-187.
- Weis-Fogh, T. (1964). Diffusion in the insect muscle, the most active tissue known. *J. Exp. Biol.* 41, 229-256.
- Westneat, M.W., Betz, O., Blob, R.W., Fezza, K., Cooper, J., und Lee, W.-K. (2003). Tracheal Respiration in Insects Visualized with Synchrotron X-ray Imaging. *Science* 299, 558-560.

Wigglesworth, V.B. (1972). The principles of insect physiology. Chapman & Hall, London.

Wilk, R., Weizman, I., und Shilo, B.-Z. (1996). *trachealess* encodes a bHLH-PAS protein that is an inducer of tracheal cell fates in *Drosophila*. *Genes Dev.* 10, 93-102.

Withlock, K. E. (1993). Development of *Drosophila* wing sensory neurons in mutants with missing or modified cell surface molecules. *Development* 117, 1251-1260.

Wodarz, A., Hinz, U., Engelbert, M., und Knust, E. (1995). Expression of *crumbs* confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* 82, 67-76.

Wodarz, A., Ramrath, A., Grimm, A., und Knust, E. (2000). *Drosophila* Atypical Protein Kinase C Associates with Bazooka and Controls Polarity of Epithelia and Neuroblasts. *J. Cell Biol.* 150, 1361–1374.

Wodarz, A., Ramrath, A., Kuchinke, U., und Knust, E. (1999). Bazooka provides an apical cue for Inscuteable localization in *Drosophila* neuroblasts. *Nature* 402, 544-547.

Wolf, C., Gerlach, N., und Schuh, R. (2002). *Drosophila* tracheal system formation involves FGF-dependent cell extensions contacting bridge-cells. *EMBO Rep.* 3, 563-568.

Wolf, C., und Schuh, R. (2000). Single mesodermal cells guide outgrowth of ectodermal tubular structures in *Drosophila*. *Genes Dev.* 14, 2140-2145.

Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessel, T., Lawrence, P., Meyerowitz, E. (1999). *Entwicklungsbiologie*. Spektrum Akademischer Verlag.

Woods, D.F., und Bryant, P.J. (1991). The *discs-large* tumor suppressor gene of *Drosophila* encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions. *Cell* 66, 451-464.

Woods, D.F., Hough, C., Peel, D., Callaini, G., und Bryant, P.J. (1996). Dlg protein is required for junction structure, cell polarity, and proliferation control in *Drosophila* epithelia. *J. Cell Biol.* 134, 1469-1482.

Woods, D.F., Wu, J.-W., und Bryant, P.J. (1997). Localization of proteins to the apico-lateral junctions of *Drosophila* epithelia. *Dev. Genet.* 20, 111-118.

Zelzer, E., und Shilo, B.-Z. (2000). Interaction between the bHLH-PAS protein Trachealess and the POU-domain protein Drifter, specifies tracheal cell fates. *Mech. Dev.* 91, 163-173.

6 Zusammenfassung

Mit *megatrachea* (*mega*) und *wurst* wurden zwei neue *Drosophila* Gene identifiziert, die für die Tracheenastmorphogenese von essentieller Bedeutung sind.

MEGA ist ein Transmembranprotein, das hohe Sequenz- und Strukturähnlichkeiten mit den aus Vertebraten bekannten Claudinen aufweist. Die Claudine stellen integrale Komponenten der Tight Junctions dar und kontrollieren die parazelluläre epitheliale Barriere. Meine Analyse zeigt, dass MEGA in funktionell äquivalenten Strukturen von Invertebraten, den Septate Junctions, lokalisiert ist. Dort beteiligt es sich an der Morphogenese gefalteter Septate Junctions, die in epithelialen Geweben zu finden sind und verschiedene Zellfunktionen, wie die Kontrolle der parazellulären Barriere, die Zellformgebung und die basolaterale Membranorganisation durchführen. *mega* Mutantenanalysen offenbaren die basolaterale Mislokalisierung essentieller Septate Junctions Komponenten, eine Veränderung der Tracheenzellform und, ähnlich wie bei den Claudinen, eine defekte transepitheliale Barrierefunktion. MEGA wird mit den integralen Septate Junction Komponenten COR und NRX koexprimiert und kolokalisiert. Mutanten- und Überexpressionsstudien demonstrieren, dass MEGA, COR und NRX in ihrer Lokalisation voneinander abhängig sind und deuten darüber hinaus eine Interaktion der drei Proteine an. Offensichtlich ist MEGA ein funktionell essentielles Septate Junction Protein, das aufgrund seiner Verwandtschaft mit den Claudinen das erste Invertebraten Claudin darstellt. Diese Ähnlichkeit zeigt, dass Septate Junctions und Tight Junctions nicht nur funktionell, sondern auch strukturell verwandt sind.

WURST, ebenfalls ein Transmembranprotein, besitzt am C-Terminus eine potentielle DnaJ-Domäne. DnaJ-Domänen sind spezifische Protein-Protein-Interaktionsdomänen, die in verschiedenen Proteinen und Proteinfamilien vorkommen. Dennoch ist WURST keiner dieser bekannten Proteinfamilien zuzuordnen. Stattdessen konnten zwei ebenfalls noch unbekannte Gene in Maus und Mensch identifiziert werden, die mit WURST signifikant hohe Sequenz- und Strukturähnlichkeiten besitzen. Mutantenanalysen offenbaren, dass WURST die Länge der Tracheenäste über tracheale Zellformveränderungen kontrolliert. Neben der Astmorphogenese beteiligt sich WURST auch an der Lokalisation apikaler Lumenmarker und an der Gasfüllung des Tracheensystems.

7 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 25.Oktober.1971
Geburtsort: Wolfhagen
Nationalität: deutsch

Werdegang

1978-1982	Grundschule Wenigenhasungen
1982-1984	Gesamtschule Zierenberg
1984-1991	Gesamtschule Wolfhagen
Juni 1991	Abitur an der Gesamtschule Wolfhagen
1991-1992	Wehrersatzdienst (Arbeiter-Samariter-Bund)
WS1993-SS1995	Biologiestudium (Universität Kassel)
WS1995-WS1999	Biologiestudium (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg)
WS1996	ERASMUS Student (University of Leeds, GB)
SS1998-WS1999	Diplomarbeit: Analyse der Entwicklung des embryonalen Tracheensystems von <i>Drosophila melanogaster</i> . Abteilung für Molekulare Entwicklungsbiologie, Max-Planck-Institut, Göttingen, Betreuer: PD. Dr. R. Schuh
März 1999	Diplom (Dipl. Biol.) an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
SS1999-SS2003	Promotionsarbeit: Molekulare Analyse der tubulären Morphogenese in <i>Drosophila melanogaster</i> . Abteilung für Molekulare Entwicklungsbiologie, Max-Planck-Institut, Göttingen, Betreuer: PD. Dr. R. Schuh
SS1999-SS2002	Doktorandenstipendium: Graduiertenkolleg „Molekulare Genetik der Entwicklung“, 242, Göttingen